MiSeqDx™ Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Katalognummer DX-102-1001: 6 Läufe, bis zu 48 Proben pro Kit

Verwendungszweck

Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose ist ein *In-vitro*-Diagnostiksystem für die gezielte Sequenzierung, das die proteincodierenden Regionen und Intron-Exon-Grenzen des *CFTR*-Gens in genomischer DNA, die aus in K_2EDTA gesammelten menschlichen peripheren Blutproben isoliert wurde, resequenziert. Der Test erkennt einzelne Nukleotidvarianten und kleine Indels innerhalb der sequenzierten Region und meldet zudem zwei tiefe intronische Mutationen und zwei große Deletionen. Der Test muss auf dem Illumina MiSeqDx-Gerät durchgeführt werden.

Der Test ist zur Unterstützung der Diagnose von Personen mit Verdacht auf zystische Fibrose (CF) vorgesehen. Dieser Assay ist am besten geeignet, wenn der Patient eine atypische oder nicht klassische Form von CF aufweist oder wenn andere Mutationspanels die beiden verursachenden Mutationen nicht nachweisen konnten. Die Ergebnisse des Tests sollten von einem zertifizierten klinischen Molekulargenetiker oder einem gleichwertig qualifizierten Kollegen interpretiert werden und in Verbindung mit anderen verfügbaren Informationen, wie z. B. klinischen Symptomen, anderen Diagnostiktests und der Krankheitsgeschichte der Familie, verwendet werden.

Dieser Test ist nicht für unabhängige Diagnosezwecke, die pränatale Diagnostik, Präimplantationstests, Träger-Screenings, Neugeborenen-Screenings oder Bevölkerungs-Screenings vorgesehen.

Zusammenfassung und Erläuterung des Assay

Klinische Beschreibung

Die Mukoviszidose (oder zystische Fibrose, ZF) ist eine der häufigsten genetischen Erkrankungen der westlichen Welt und die am häufigsten auftretende lebensbedrohliche autosomal-rezessive Erkrankung in der nicht-hispanischen weißen Bevölkerung[1-5]. ZF wirkt sich auf die Viskosität der Schleimsekrete aus und befällt die Epithelien der Atemwege, die Bauchspeicheldrüse, den Darm, das hepatobiliäre System, den männlichen Genitaltrakt und die Schweißdrüsen, was zu einer komplexen Multiorgan-, Multisystemerkrankung führt[2-4], wobei die Lunge das primäre Organ bezüglich Morbidität und Mortalität ist[6]. In vielen Fällen sind eine Mangelernährung oder Verdauungsstörungen Vorboten von durch ZF verursachten Lungenerkrankungen. Ein Schwerpunkt der aktuellen interventionellen Anstrengungen liegt daher in der Früherkennung der Erkrankung durch ein Neugeborenen-Screening[5], wodurch die frühzeitige lebenswichtige medizinische Versorgung sichergestellt und für Menschen mit dieser Erkrankung das bestmögliche Ergebnis erzielt werden soll[2,5]. Obwohl es bei der Lebenserwartung geschlechtliche Unterschiede gibt – die mittlere Lebenserwartung ist bei Männern höher als bei Frauen – liegt die allgemeine Lebenserwartung in den USA bei 38,3 Jahren[6].

CFTR-Varianten und Inzidenz

Das Gen „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (*CFTR*) wurde 1989 identifiziert. Es befindet sich am langen Arm des Chromosoms 7 und enthält 27 kodierende Exons, verteilt über 230 kb[2]. Eine 6,5-kb-mRNA, die von dem normalen Allel produziert wird, kodiert CFTR, ein 1490-Aminosäure-haltiges Membranprotein, das als regulierter Chlorid-Kanal in den Epithelzellen mehrerer Organe fungiert[2,3]. Derzeit sind über 1.900 Varianten des *CFTR*-Gens beschrieben, wobei die Mehrheit davon Punktmutationen sind[7]. Die häufigste *CFTR*-Variante ist das F508del-Allel[3],

das fast 70 % aller *CFTR*-Varianten ausmacht[1]. Allerdings resultieren die anderen häufig auftretenden *CFTR*-Varianten oft in einem CF-Phänotyp und anderen auf CFTR zurückzuführenden Erkrankungen[1-3].

Die Mukoviszidose hat eine geschätzte Erkrankungshäufigkeit von einer in 2.000 bis 4.000 Lebendgeburten und eine Prävalenz von rund 30.000 Personen in der US-Bevölkerung[2]. Sie tritt in allen ethnischen Gruppierungen mit unterschiedlicher Häufigkeit auf: 1:3.000 bei Weißen, 1:9.200 bei Hispanoamerikanern, 1:10.900 bei amerikanischen Ureinwohnern, 1:15.000 bei Afroamerikanern und 1:31.000 bei der asiatisch-amerikanischen Bevölkerung[2,4]. Allerdings wird die Zuweisung einer Ethnie auf eine betroffene Person immer schwieriger[8]. Aktuelle Schätzwerte der Häufigkeit der Träger der CFTR-Mutation nach Ethnizität in den USA auf Basis einer Kohorte von 364.890 Personen, die zum Trägertest überwiesen wurden und bezüglich Mukoviszidose nicht familiär vorbelastet sind, werden in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1 Allgemeine Trägerhäufigkeit von Mukoviszidose-Mutationen in den verschiedenen ethnischen Gruppen in den USA[9]

Ethnische Gruppe	Beobachtete Trägerhäufigkeit
Afroamerikanisch	1 aus 84
Aschkenasi Jüdisch	1 aus 29
Asiatisch	1 aus 242
Weiß	1 aus 28
Hispanoamerikanisch	1 aus 59
Jüdisch	1 aus 32
Nahöstlich	1 aus 91
Ureinwohner Nordamerikas	1 aus 70
Südasiatisch	1 aus 118
Sonstige ethnische Gruppe	1 aus 111
> 1 ethnische Gruppe	1 aus 34
Teilweise afroamerikanisch	1 aus 56
Teilweise weiß	1 aus 32
Teilweise hispanoamerikanisch	1 aus 51
Keine Angabe	1 aus 37
Alle Personen	1 aus 38

Assay-Design

Alle proteincodierenden Regionen im *CFTR*-Gen einschließlich 10 nt flankierender intronischer Sequenz werden für alle außer drei Exons (Exon 7, 10 und 20) nachgewiesen. Bei Exon 7 und Exon 10 werden nur 5 nt flankierende intronische Sequenz am 5'-Ende des Exons einbezogen, um proximale homopolymere Indels zu vermeiden. Bei Exon 20 werden 30 nt flankierender intronischer Sequenz am 5'-Ende des Exons einbezogen, um den Nachweis der Mutation 3272-26A>G zu ermöglichen. Darüber hinaus weist der Assay ca. 100 nt flankierender Sequenz an den 5'- und 3'-UTRs, zwei tiefe intronische Mutationen (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T), zwei große Deletionen (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) und die PolyTG/PolyT-Region nach. Die komplette Abdeckung des Assays wird in den Positionen der genomischen Koordinaten in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2 MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose – Abdeckung der genomischen Koordinaten

	hg19 Anfang der genomischen Koordinate (chr7)	hg19 Ende der genomischen Koordinate (chr7)	Länge (Basenpaar)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon 2	117144297	117144427	131
CFTR_Exon 3	117149078	117149206	129
CFTR_Exon 4	117170943	117171178	236
CFTR_Exon 5	117174320	117174429	110
CFTR_Exon 6	117175292	117175475	184
CFTR_Exon 7^	117176597	117176737	141
CFTR_Exon 8	117180144	117180410	267
CFTR_Exon 9	117182060	117182172	113
CFTR_Exon 10^	117188690	117188887	198
CFTR_Exon 11	117199508	117199719	212
CFTR_Exon 12	117227783	117227897	115
CFTR_Intron 12*	117229516	117229526	11
CFTR_Exon 13	117230397	117230503	107
CFTR_Exon 14	117231978	117232721	744
CFTR_Exon 15	117234974	117235122	149
CFTR_Exon 16	117242870	117242927	58
CFTR_Exon 17	117243576	117243846	271
CFTR_Exon 18	117246718	117246817	100
CFTR_Exon 19	117250563	117250733	171
CFTR_Exon 20#	117251605	117251872	268
CFTR_Exon 21	117254657	117254777	121
CFTR_Exon 22	117267566	117267834	269
CFTR_Intron 22*	117280010	117280020	11
CFTR_Exon 23	117282482	117282657	176

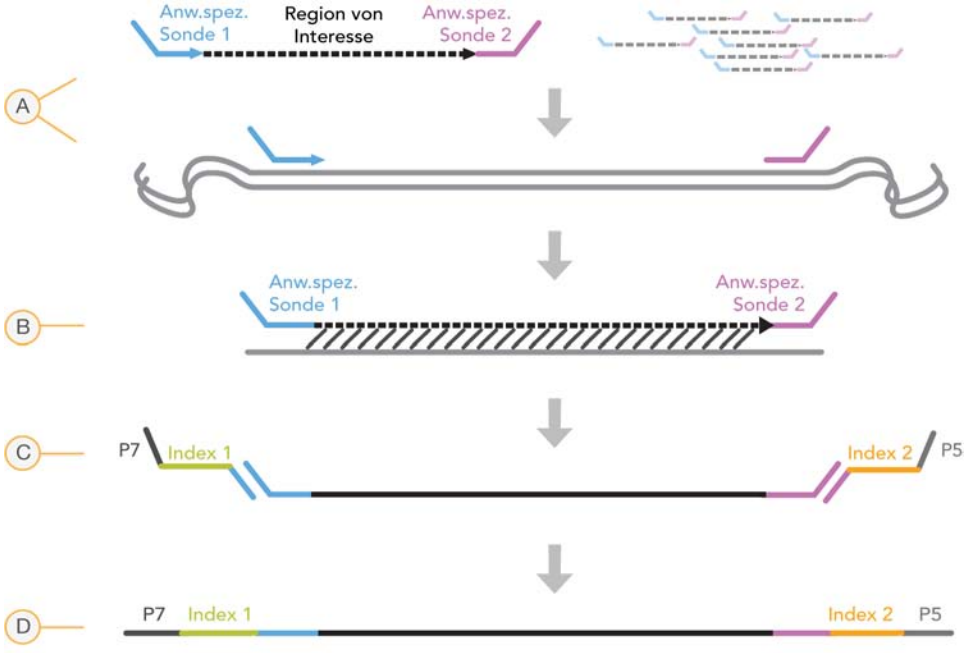
	hg19 Anfang der genomischen Koordinate (chr7)	hg19 Ende der genomischen Koordinate (chr7)	Länge (Basenpaar)
CFTR_Exon 24	117292886	117292995	110
CFTR_Exon 25	117304732	117304924	193
CFTR_Exon 26	117305503	117305628	126
CFTR_Exon 27	117306952	117307262	311
Summe Basen			5203**

^ Bei Exon 7 und Exon 10 werden nur 5 nt flankierende intronische Sequenz stromaufwärts vom Exon einbezogen. Dies dient der Vermeidung homopolymerer Abschnitte in diesen Regionen. Im Falle von Exon 10 ist dies die PolyT/Poly TG-Region in Intron 9. Diese Region wird speziell und separat behandelt.
* Bei den tiefen intronischen Mutationen werden 5 die SNV auf beiden Seiten flankierende Nukleotide einbezogen.
# Bei Exon 20 werden 30 nt flankierende intronische Sequenz am 5'-Ende des Exons einbezogen, um den Nachweis der Mutation 3272-26A>G zu ermöglichen.
** Mit den zwei großen Deletionen und den PolyTG/PolyT-Regionen gibt es insgesamt 5206 Positionen/Regionen.

Verfahrensprinzipien

Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose umfasst zwei Hauptverfahren. Das erste Verfahren, die Bibliotheksvorbereitung, besteht im manuellen Vorbereiten der Proben für die Sequenzierung. Die Bibliotheksvorbereitung besteht aus vier wichtigen Schritten: Hybridisierung, Extension-Ligation, PCR-Amplifikation und Bibliotheksnormalisierung. Das zweite Verfahren ist das Sequenzieren der vorbereiteten Probe mithilfe der SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis) auf dem MiSeqDx-Gerät.

Bibliotheksvorbereitung



A **Hybridisierung** – Im ersten Schritt, der Hybridisierung, wird ein Pool von Upstream- und Downstream-Oligonukleotiden, der spezifisch für den MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose ist, in die genomische DNA-Probe hybridisiert. Am Ende des Vorgangs entfernt ein Waschlauf in drei Schritten anhand eines Filters, der eine Größenauswahl vornehmen kann, ungebundene Oligonukleotide aus der genomischen DNA.

B **Extension-Ligation** – Im zweiten Schritt, der Extension-Ligation, werden die hybridisierten Upstream- und Downstream-Oligonukleotide verbunden. Eine DNA-Polymerase erstreckt sich von den Upstream-Oligonukleotiden über die Zielregion hinaus, gefolgt von der Ligation mit dem 5'-Ende des Downstream-Oligonukleotids mittels DNA-Ligase. Das Ergebnis besteht in der Bildung von Produkten, die die CF-spezifischen Oligonukleotide enthalten, flankiert von Sequenzen, die für die Amplifikation benötigt werden.

C **PCR-Amplifikation** – Im dritten Schritt, der PCR-Amplifikation, werden die Extension-Ligation-Produkte unter Verwendung von Primern, die Indexsequenzen für die Proben-Multiplexierung hinzufügen, sowie von gängigen Adaptern, die für die Clusterbildung auf dem MiSeqDx-Gerät erforderlich sind, amplifiziert. Am Ende dieses Vorgangs reinigt ein PCR-Reinigungsverfahren die PCR-Produkte (die als Bibliothek bezeichnet werden).

D **Bibliotheksnormalisierung** – Im letzten Schritt, der Bibliotheksnormalisierung, wird die Quantität jeder Bibliothek normalisiert, um eine einheitlichere Bibliotheksdarstellung in der endgültigen Pool-Bibliothek sicherzustellen. Am Ende dieses Vorgangs wird die Pool-Bibliothek zur Sequenzierung mit der SBS-Chemie auf das MiSeqDx-Gerät geladen.

Sequenzierung

Die SBS-Chemie verwendet eine Methode mit reversiblen Terminatoren, um einzelne Nukleotidbasen zu erkennen, die in wachsende DNA-Stränge eingebaut sind. Während eines Sequenzierungszyklus wird ein einzelnes, mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes Desoxynukleotid-Triphosphat (dNTP) zur Nukleotid-Säurekette hinzugefügt. Die Nukleotid-Kennzeichnung dient als Terminator für die Polymerisation, d. h. nach jeder dNTP-Inkorporation wird der Fluoreszenzfarbstoff bildlich erfasst, um die Base zu identifizieren, und dann enzymatisch gespalten, um die Inkorporation des nächsten Nukleotids zu ermöglichen. Da alle vier an reversible Terminatoren gebundenen dNTPs (A, G, T, C) als einzelne, separate Moleküle vorhanden sind, werden Integrationsfehler durch natürliche Wettbewerbsmechanismen minimiert. Base-Calls erfolgen bei jedem Sequenzierungszyklus direkt anhand von Signalstärkemessungen. Das Endergebnis ist eine Base für Base erfolgende Sequenzierung.

Datenanalyse

MiSeq Reporter verarbeitet die im Rahmen der Primäranalyse generierten Base-Calls und liefert basierend auf den Angaben im Probenblatt Informationen zu jeder Probe. Dieser Schritt wird Sekundäranalyse genannt. Die Sekundäranalyse umfasst die Demultiplexierung, die FASTQ-Dateigenerierung, das Alignment, das Varianten-Calling und das Generieren von VCF-Dateien, die Informationen zu CFTR-Varianten enthalten, die an speziellen Positionen im Referenzgenom gefunden wurden.

- **Demultiplexierung** – Dies ist der erste Schritt der Sekundäranalyse, wenn im Probenblatt mehrere Proben aufgelistet sind und der Lauf über Index-Reads verfügt. Die Demultiplexierung trennt Daten aus zusammengefassten Proben auf der Basis der eindeutigen Sequenzindizes, die während der PCR-Amplifikation hinzugefügt wurden.
- **Generieren von FASTQ-Dateien** – Nach der Demultiplexierung generiert MiSeq Reporter temporäre Dateien im FASTQ-Dateiformat, dem Textformat für die Darstellung von Sequenzen. FASTQ-Dateien enthalten die Reads für jede Probe sowie die Qualitäts-Scores (ausgenommen Reads von Clustern, die den Filter nicht passiert haben.
- **Alignment** – Beim Alignment werden Sequenzen mit der Referenz verglichen, um eine Beziehung zwischen den Sequenzen zu identifizieren. Außerdem wird ein Score basierend auf Ähnlichkeitsregionen zugewiesen. Ausgerichtete Reads werden in Dateien im BAM-Format gespeichert. MiSeq Reporter verwendet einen „banded“ Smith-Waterman-Algorithmus, der lokale Sequenz-Alignments durchführt, um ähnliche Regionen zwischen zwei Sequenzen zu ermitteln.

- **Varianten-Calling** – Bei diesem Schritt werden einzelne Nukleotidvarianten (SNVs), Insertionen und Deletionen (Indels) und weitere strukturierte Varianten in einer standardisierten und analysierbaren Textdatei mit dem Namen MiSeqDxCFClinicalSequencingAssay.txt aufgezeichnet. Weitere Informationen hierzu finden Sie im Abschnitt „Analyseberichtsdatei“ im *MiSeq Reporter – Benutzerhandbuch (Teile-Nr. 15038356_DEU)*.

Einschränkungen des Verfahrens

1. Die Assay-Sequenzen der folgenden Regionen im CFTR-Gen:
   a. Alle proteincodierenden Regionen im CFTR-Gen über 27 Exone hinweg
   b. Zwischen 5 und 10 Basen flankierender intronischer Sequenz
   c. Hundert Nukleotide intronischer Sequenz an den 5′- und 3′-UTRs (untranslatierte Regionen)
   d. Zwei tiefe intronische Mutationen (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T)
   e. Die PolyTG/PolyT-Sequenz in Intron 9
   f. Insgesamt 5206 Positionen/Regionen von den möglichen 188.702 Basenpaaren im Gen.
2. Für *In-Vitro*-Diagnostik: Die mit dem Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose erzielten Ergebnisse sollten im Kontext einer vollständigen klinischen Bewertung verwendet und interpretiert werden.
3. Der Assay ist für das Sequenzieren der Protein-kodierenden Regionen und der Intron/Exon-Übergänge des CFTR-Gens konzipiert. Er enthält nicht alle intronischen Regionen und großen Deletionen. Daher ist auch bei einem „Wildtyp“-Gesamtergebnis nicht auszuschließen, dass die analysierten Proben andere Mutationen/Varianten des Gens „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (*CFTR*) enthalten.
   — Der Assay dient dem Erkennen von zwei spezifischen großen Deletionen: CFTRdele2,3 und CFTRdele22,23. Andere große Deletionen werden nicht ermittelt oder protokolliert. Dieser Assay ist nur für Insertionen und Deletionen einer Größe von maximal 3 bp validiert.
4. Die Häufigkeit der von diesem Assay ermittelten Varianten ist je nach Bevölkerungsgruppe unterschiedlich. Es ist nicht möglich, alle Variantenkombinationen zu validieren, die dieser Assay im *CFTR*-Gen nachweisen könnte. Es wird empfohlen, neue und seltene Varianten mit einer validierten Referenzmethode zu bestätigen.
5. Wie bei jedem auf Hybridisierung basierenden Assay können zugrundeliegende Polymorphismen oder Mutationen in Oligonukleotid-bindenden Regionen die untersuchten Allele und somit die Anzahl der Calls beeinträchtigen.
6. Wenn mehr als zwei Varianten in einer Probe identifiziert werden, sollte der Benutzer das Ergebnis verifizieren, indem er die Probe unter Verwendung des Gerätesystem mit einem frischen gDNA-Extrakt wiederholt, um eine Kreuzkontamination der Probe auszuschließen.

   HINWEIS: Es sollte eine Haplotyp-Phasierung in Betracht gezogen werden, wenn zwei oder mehr Varianten nachgewiesen werden. Dieser Assay kann nicht feststellen, ob sich Varianten in cis/trans-Ausrichtung zu anderen Varianten befinden.
7. In der MiSeq Reporter-Software werden alle Insertionen/Deletionen in Homopolymer-Regionen linksbündig ausgewiesen. Beispielsweise wird die Variante 444delA als eine GA-TC-Deletion identifiziert, während die Deletion in dbSNP als eine G-ATC-Deletion angegeben wird. Eine Ausnahme hiervon bilden die 135 CF-Variationen, die in der CFTR2-Datenbank als krankheitsverursachend aufgeführt sind (basierend auf einer Variantenliste vom September 2013). Alle Indels in Homopolymer-Regionen innerhalb dieser Gruppe von Variationen stimmen mit den erwarteten Variantennachweisen gemäß CFTR2[10] überein.
8. Der Assay kann nicht feststellen, ob die Ausrichtung der PolyTG/PolyT-Variante cis/trans zu anderen Varianten ist. Bei Patienten mit einer R117H-Variante sollten weitere Tests durchgeführt werden, um festzustellen, ob sich eine PolyTG/PolyT-Variante, die den klinischen Phänotyp [z. B. 12-13 (TG) oder 5T] beeinflussen kann, in cis/trans-Ausrichtung befindet.
   — PolyTG/PolyT sind Homopolymer-Regionen, die aufgrund des Verrutschens der DNA-Polymerase (Slippage) bekanntermaßen schwer zu sequenzieren sind.

9 Dieser Assay wird ausschließlich in einem 8-Plex-Format ausgeführt. Wenn keine sechs klinische Proben verfügbar sind, ausgenommen die positive und die negative Kontrollprobe, müssen andere Proben menschlicher genomischer DNA für den Lauf verwendet werden.

Produktkomponenten

Die Illumina MiSeqDx-Plattform umfasst folgende Komponenten:

- MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose (Katalog-Nr. DX-102-1001)
- MiSeqDx-Gerät (Katalognummer DX-410-1001)

Reagenzien

Bereitgestellte Reagenzien

Reagenzien für den Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose (Katalognummer DX-102-1001) werden von Illumina bereitgestellt. Dieses Kit wurde für sechs Läufe mit maximal acht Probem pro Lauf (insgesamt bis zu 48 Proben) konfiguriert.

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 1

Tabelle 3 Karton 1A Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay	1 Röhrchen	600 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Oligonukleotiden, die auf das *CFTR*-Gen abzielen	-25 °C bis -15 °C
Hybridisierungspuffer	1 Röhrchen	4,32 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Formamid	-25 °C bis -15 °C
Extension-Ligation-Mischung	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit einer proprietären Mischung aus DNA-Polymerasen, DNA-Ligasen und dNTPs	-25 °C bis -15 °C
Index-Primer C (A503), D (A504) und E (A505)	1 Röhrchen pro Primer	192 µl	PCR-Primer mit Indexsequenzen und Sequenzierungsadaptern	-25 °C bis -15 °C
Index-Primer 1 (A701), 2 (A702) und 10 (A710)	1 Röhrchen pro Primer	128 µl	PCR-Primer mit Indexsequenzen und Sequenzierungsadaptern	-25 °C bis -15 °C
PCR-Polymerase	1 Röhrchen	56 µl	Proprietäre DNA-Polymerase	-25 °C bis -15 °C
PCR-Master-Mischung	1 Röhrchen	2,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und dNTPs	-25 °C bis -15 °C

Tabelle 4 Karton 1B Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Bibliotheksnormalisierungsverdünner	1 Röhrchen	4,6 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	-25 °C bis -15 °C
Bibliothek-Verdünnungspuffer	1 Röhrchen	4,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung	-25 °C bis -15 °C
Interne PhiX-Kontrolle	1 Röhrchen	10 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit genomischer PhiX-DNA	-25 °C bis -15 °C

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 2

Tabelle 5 Karton 2 Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Inhalt	Lagerung
MiSeqDx-Reagenzienkartusche - Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay	6 Kartuschen	Einweg-Kartusche mit Clusterbildungs- und Sequenzierungsreagenzien für die Verwendung mit dem MiSeqDx-Gerät, einschließlich Formamid, 2-Mercaptoethanol und 2 % DMSO	-25 °C bis -15 °C

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 3

Tabelle 6 Karton 3A Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Stringenter Wasch-Puffer	1 Flasche	24 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	2 °C bis 8 °C
Universeller Wasch-Puffer	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 °C bis 8 °C

Tabelle 7 Karton 3B Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
PCR-Reinigungs-Beads	1 Röhrchen	5 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festphasigen paramagnetischen Beads und Polyethylenglykol	2 °C bis 8 °C
Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer	2 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	2 °C bis 8 °C
Bibliothek-Beads	1 Röhrchen	1,2 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festphasigen paramagnetischen Beads	2 °C bis 8 °C
MiSeqDx-Fließzelle - Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay	6 Behälter	1 Fließzelle	Glassubstrat mit kovalent gebundenen Oligonukleotiden	2 °C bis 8 °C

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 4

Tabelle 8 Karton 4 Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
MiSeqDx-SBS-Lösung (PR2) - Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay	6 Flaschen	353,1 ml	Gepufferte wässrige Lösung	2 °C bis 8 °C

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 5

Tabelle 9 Karton 5 Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Filterplatte	6 Platten	N/A	Polypropylen-Mikrotiterplatte mit einer modifizierten Polyethersulfonmembran	15 °C bis 30 °C

Tabelle 10 Karton 5 Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Elutionspuffer	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C
Bibliothek-Lagerungspuffer	1 Röhrchen	3,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Reagenzien

Voramplifikationsreagenzien

- 10 N NaOH (aus Tabletten herstellen oder Standardlösung verwenden)
- TE-Puffer
- DNase- und RNase-freies Wasser

Nachamplifikationsreagenzien

- 10 N NaOH (aus Tabletten herstellen oder Standardlösung verwenden)
- Ethanol absolut für die Molekularbiologie
- TE-Puffer
- DNase- und RNase-freies Wasser

Lagerung und Handhabung

1. Die Raumtemperatur ist mit 15 °C bis 30 °C definiert.
2. Die folgenden Reagenzien werden gefroren ausgeliefert und sind stabil, wenn sie bis zum angegebenen Verfallsdatum bei -25 °C bis -15 °C gelagert werden.
   - Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay
   - Hybridisierungspuffer
   - Extension-Ligation-Mischung
   - Index-Primer C (A503), D (A504) und E (A505)
   - Index-Primer 1 (A701), 2 (A702) und 10 (A710)
   - PCR-Polymerase
   - PCR-Master-Mischung
   - Bibliotheksnormalisierungsverdünner
   - Bibliothek-Verdünnungspuffer
   - Interne PhiX-Kontrolle
   - MiSeqDx-Reagenzienkartusche - Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay

   Mit Ausnahme der Reagenzienkartusche sind die Reagenzien für maximal 6 vor dem angegebenen Verfallsdatum durchgeführte Gefrier/Auftau-Zyklen stabil.

   Frieren Sie die Reagenzienkartusche nicht mehr ein, nachdem sie aufgetaut wurde. Sie kann bei 2 °C bis 8 °C bis zu sechs Stunden lang gelagert werden.
3. Die folgenden Reagenzien werden gekühlt ausgeliefert und sind stabil, wenn sie bis zum angegebenen Verfallsdatum bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
   - Stringenter Wasch-Puffer
   - Universeller Wasch-Puffer
   - PCR-Reinigungs-Beads
   - Bibliothek-Beads
   - Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer
   - MiSeqDx-SBS-Lösung (PR2) - Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay
   - MiSeqDx-Fließzelle - Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay
4. Die folgenden Reagenzien werden in Umgebungstemperatur ausgeliefert und sind stabil, wenn sie bei Raumtemperatur bis zum angegebenen Verfallsdatum gelagert werden.
   - Elutionspuffer
   - Filterplatte
   - Bibliothek-Lagerungspuffer

5 Änderungen an der physischen Struktur der bereitgestellten Reagenzien kann auf eine Schädigung der Materialien hindeuten. Verwenden Sie die Reagenzien nicht, wenn Änderungen an der physischen Struktur auftreten (z. B. offensichtliche Veränderungen der Reagenzienfarbe oder Eintrübung mit offenkundiger Keimkontamination).
6 Die Reagenzien Hybridisierungspuffer, Stringenter Wasch-Puffer und Bibliotheksnormalisierungsverdünner können sichtbare Ausfällungen oder Kristalle bilden. Mischen Sie vor der Verwendung kräftig mit dem Vortexer und stellen Sie anschließend visuell sicher, dass keine Ausfällungen vorhanden sind.
7 Beachten Sie die folgenden Best Practices beim Umgang mit PCR-Reinigungs-Beads und Bibliothek-Beads:
   — Die Beads dürfen niemals eingefroren werden.
   — Die Beads sollten Raumtemperatur haben.
   — Mischen Sie die Beads unmittelbar vor der Verwendung mit dem Vortexer, bis sie gut suspendiert sind und die Farbe homogen erscheint.
   — Mischen Sie die Probe nach dem Hinzufügen der Beads gründlich, indem Sie zehnmal auf- und abpipettieren. Die Proben können auch mit einem Schüttler sorgfältig gemischt werden.
   — Inkubieren Sie die Bead/Probenmixtur bei Raumtemperatur für die gesamte angegebene Dauer.
   — Folgen Sie den Anweisungen, wenn Sie das Magnetstativ verwenden. Warten Sie, bis die Lösung klar ist, bevor Sie aspirieren. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ, wenn Sie den Überstand langsam aspirieren. Achten Sie dabei darauf, dass die separierten Beads nicht durcheinandergebracht werden.
8 Die PCR-Amplifikationsplatte kann über Nacht auf dem Thermocycler bleiben oder bei 2 °C bis 8 °C bis zu zwei Tage lang gelagert werden. Versiegeln Sie vor dem Lagern der Platte bei 2 °C bis 8 °C den Platten-Well.
9 Frieren Sie die Bibliothek-Beads nicht ein bzw. vermischen Sie sie nicht mit dem Bibliotheksnormalisierungsverdünner-Reagenz, wenn sie nicht sofort verwendet werden.
10 Die vollständige Bibliotheksnormalisierungsplatte kann bei -25 °C bis -15 °C bis zu 3 Tage lang gelagert werden.
11 Die Pooled Amplicon Library (PAL) kann bei -25 °C bis -15 °C bis zu 3 Tage lang gelagert werden.
12 Laden Sie den frisch vorbereiteten, verdünnten Amplikon-Pool sofort in die Reagenzienkartusche. Die Lagerung des verdünnten Amplikon-Pools kann zu einer signifikanten Verringerung der Clusterdichte führen.

Geräte und Materialien

Bereitgestellte, separat erhältliche Geräte und Materialien

1 **MiSeqDx-Gerät**, Katalognummer DX-410-1001
2 **TruSeq-Indexplattenvorrichtungs-Kit**, Katalognummer FC-130-1005
3 **TruSeq-Indexplattenvorrichtungs- und -Kranz-Kit**, Katalognummer FC-130-1007
4 **Ersatzverschlüsse für Indexadapter**, Katalognummer DX-502-1003

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

Geräte und Materialien für die Voramplifikation

1 **Hitzeblock** – Es wird ein Hitzeblock für eine 96-Well-Platte benötigt. Der Hitzeblock muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen. Hitzeblöcke mit beheizten Deckeln sind zur Verwendung akzeptabel.
   — Temperaturbereich: Umgebung +5 °C bis 99 °C
   — Temperatursteuerung: ±0,1 °C bei 37 °C; ±0,4 °C bei 60 °C
2 **Probeninkubator** – Es wird ein Inkubator (Hybridisierungsofen) benötigt. Der Inkubator muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen.
   — Temperaturbereich: 10 bis 100 °C
   — Temperatursteuerung: ±0,2°C

3 **Tischzentrifuge** – Es wird eine Tischzentrifuge benötigt, die die Temperatur von 20 °C halten kann. (Es wird eine separate Zentrifuge im Nachamplifikationsbereich benötigt.) Es kann jede Plattenzentrifuge verwendet werden, die die vorgesehenen Geschwindigkeiten des Protokolls erreicht (280 bis 2400 x g).
4 **Präzisionspipetten** – Es wird ein Satz Präzisionspipetten benötigt. (Es wird ein separater Satz im Nachamplifikationsbereich benötigt.) Die Verwendung von Präzisionspipetten ist notwendig, um eine genaue Reagenz- und Probenabgabe zu gewährleisten. Es können Einzel- oder Mehrkanalpipetten verwendet werden, wenn sie regelmäßig kalibriert werden und ihre Genauigkeit innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegt.
5 **Verbrauchsmaterialien** – Die folgenden Verbrauchsmaterialien werden benötigt.
   — 96-Well-PCR-Platten mit Rahmen, 0,2 ml, Polypropylen oder vergleichbar
   HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass die 96-Well-Platte zum Magnetstativ passt.
   — 96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)
   — Lösungsbecken, PVC, DNase-/RNase-frei (Bottich)
   — Klebende Aluminiumfolienversiegelung
   — Entsprechende PCR-Plattenversiegelung
   — Aerosol-resistente Pipettenspitzen

Geräte und Materialien für die Nachamplifikation

1 **Thermocycler** – Es wird ein Thermocycler benötigt. Der Thermocycler muss einen beheizbaren Deckel besitzen und den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen:
   — Temperatursteuerungsbereich: 4 °C bis 99 °C
   — Steuerungsgenauigkeit: ±0,25 °C von 35 °C bis 99 °C
2 **Mikroplattenschüttler** – Es wird ein Mikroplattenschüttler im Nachamplifikationsbereich des Labors benötigt. Der Plattenschüttler muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen:
   — Maximale Mischgeschwindigkeit: 3.000 rpm
   — Mischgeschwindigkeitsbereich: 200 bis 3.000 rpm
3 **Tischzentrifuge** – Es wird eine Tischzentrifuge benötigt, die die Temperatur von 20 °C halten kann. (Es wird eine separate Zentrifuge im Voramplifikationsbereich benötigt.) Es kann jede Plattenzentrifuge verwendet werden, die die vorgesehenen Geschwindigkeiten des Protokolls erreicht (280 bis 2400 x g).
4 **Hitzeblock** – Es wird ein Hitzeblock für Röhrchen benötigt. Der Hitzeblock muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen.
   — Temperaturbereich: Umgebung +5 °C bis 99 °C
   — Temperatursteuerung: ±0,1 °C bei 37 °C; ±0,4 °C bei 60 °C
5 **Magnetstativ** – Es wird ein Magnetstativ für eine 96-Well-Platte benötigt. Die Leistung ist besser, wenn sich die Magnete an der Seite des Stativs und nicht am Boden befinden.
6 **Präzisionspipetten** – Es wird ein Satz Präzisionspipetten benötigt. (Es wird ein separater Satz im Voramplifikationsbereich benötigt.) Die Verwendung von Präzisionspipetten ist notwendig, um eine genaue Reagenz- und Probenabgabe zu gewährleisten. Es können Einzel- oder Mehrkanalpipetten verwendet werden, wenn sie regelmäßig kalibriert werden und ihre Genauigkeit innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegt.
7 **Verbrauchsmaterialien** – Die folgenden Verbrauchsmaterialien werden benötigt.
   — 96-Well-PCR-Platten mit Rahmen, 0,2 ml, Polypropylen oder vergleichbar
   — 96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)
   HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass die 96-Well-Platte zum Magnetstativ passt.
   — Konische 15-ml-Röhrchen
   — Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen (Schraubverschluss empfohlen)
   — PCR-8-fach-Röhrchenstreifen
   — Lösungsbecken, PVC, DNase-/RNase-frei (Bottich)
   — Klebende Aluminiumfolienversiegelungen

- Klebende Plattenversiegelungen
- Aerosol-resistente Pipettenspitzen

Probenerfassung, Transport und Lagerung

ANMERKUNG
Behandeln Sie alle Proben wie potenzielle Infektionserreger.

1. Vollblutproben, die in K_2EDTA-Röhrchen gesammelt wurden, können verwendet werden.
2. Vollblutproben können bei Raumtemperatur maximal sieben Tage, bis zu 30 Tage bei 2 °C bis 8 °C oder gefroren bei -25 °C bis -15 °C bis zu 30 Tage lang gelagert werden.
3. Transportieren Sie Vollblut bei Raumtemperatur maximal sieben Tage lang, bei 2 °C bis 8 °C maximal 30 Tage lang oder gefroren bei -25 °C bis -15 °C maximal 30 Tage lang. Beim Transport von Vollblut müssen die länderspezifischen, Bundes-, staatlichen und regionalen Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern eingehalten werden.
4. Nach dem sechsmaligen Einfrieren und Auftauen von genomischer DNA wurden keine negativen Auswirkungen auf die Assay-Leistung beobachtet.
5. Bei Vollblutproben mit erhöhten Bilirubin-, Cholesterin-, Hämoglobin-, Triglycerid- bzw. EDTA-Werten wurden keine negativen Auswirkungen auf die Assay-Leistung beobachtet.

Warn- und Vorsichtshinweise

ACHTUNG!
Gemäß geltenden Gesetzen ist der Verkauf oder die Nutzung dieses Geräts nur über einen Arzt bzw. im Auftrag eines Arztes oder einer anderen Fachperson mit entsprechender Lizenz zulässig.

1. Einige Komponenten dieses Assays enthalten Formamid, ein aliphatisches Amid, das in Verdacht steht, ein fortpflanzungsgefährdendes Toxin zu sein. (Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Reagenzien* auf Seite 7.) Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Behälter und nicht verwendeter Inhalt müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region entsorgt werden. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.
2. Einige Komponenten dieses Assays enthalten das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol. (Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Reagenzien* auf Seite 7.) Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Die Verwendung muss in einem gut belüfteten Bereich stattfinden und alle Behälter und nicht verwendeten Inhalte müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region entsorgt werden. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.
3. Behandeln Sie alle Proben wie potenzielle Infektionserreger.
4. Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Abnahme der Probenqualität führen.
5. Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie bei der Handhabung von Proben und Assay-Reagenzien Einweg-Handschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach der Handhabung von Proben und Assay-Reagenzien gründlich die Hände.
6. Verwenden Sie Assay-Komponenten nicht mehr nach ihrem auf dem Etikett des Assay-Kartons angegebenen Verfallsdatum. Tauschen Sie Assay-Komponenten aus unterschiedlichen Assay-Chargen nicht gegeneinander aus. Beachten Sie, dass die Assay-Charge auf dem Etikett des Assay-Kartons angegeben ist.
7. Lagern Sie die Assay-Komponenten bei der angegebenen Temperatur in ausgewiesenen Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereichen.
8. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen (bis zu sechsmal) der Komponenten aus Karton 1 beeinträchtigt die Integrität des Assays nicht.

9 Um eine Zersetzung der Proben oder Reagenzien zu verhindern, stellen Sie sicher, dass alle Natriumhypochloritdämpfe vollständig abgeführt wurden, bevor Sie das Protokoll starten.
10 Ordnungsgemäße Laborpraktiken und eine gute Laborhygiene sind unerlässlich, um eine Kontaminierung von Reagenzien, Instrumenten und genomischen DNA-Proben durch PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontaminierung durch PCR-Produkte kann zu falschen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.
11 Stellen Sie zur Verhinderung einer Kontaminierung sicher, dass die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche über eigene Geräte (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Vortexer und Zentrifuge) verfügen.
12 Vermeiden Sie eine Kreuzkontaminierung. Verwenden Sie nach jeder Probe und nach der Abgabe von Reagenzien jeweils frische Pipettenspitzen. Mischen Sie Proben mit einer Pipette und zentrifugieren Sie die Platte, wenn dies angegeben ist. Mischen Sie die Platten nicht mit dem Vortexer. Die Verwendung von Aerosol-resistenten Spitzen verringert das Risiko einer Amplikon-Übertragung und einer Kreuzkontaminierung von Probe zu Probe.
13 Die Index-Proben-Paarung muss genau dem Probenblatt entsprechen. Abweichungen zwischen dem Probenblatt und dem Plattenlayout führen zu einem Verlust der positiven Probenidentifikation und fehlerhaften Ergebnisberichten.
14 Bereiten Sie stets frisches 80%iges Ethanol für die Schritte des Waschlaufs zu. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen, was die Ergebnisse verfälscht.
15 Stellen Sie sicher, dass während der Waschschritte das gesamte Ethanol vom Boden der Wells entfernt wird. Ethanolreste können die Ergebnisse beeinträchtigen.
16 Halten Sie nach dem Magnetstativ-Schritt die angegebene Trockenzeit ein, um eine vollständige Evaporation sicherzustellen. Ethanolreste können den Ablauf nachfolgender Reaktionen beeinträchtigen.
17 Mischen Sie den Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay und den Hybridisierungspuffer nicht zum Lagern. Wenn diese vermischt werden, wird der Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay selbst bei Gefrierlagerung instabil.
18 Die Verwendung von Thermocyclern mit aktiver Abkühlung (z. B. Peltier, thermoelektrisch gekühlt) wird für den Hybridisierungsschritt nicht empfohlen. Der Schritt der passiven Abkühlung ist für eine ordnungsgemäße Hybridisierung ausschlaggebend.
19 Fügen Sie PCR-Polymerase immer erst direkt vor dem Gebrauch zur PCR-Master-Mischung hinzu. Bewahren Sie die kombinierte Gebrauchslösung niemals auf.
20 Während des Bibliotheksnormalisierungsschritts ist es äußerst wichtig, das Bibliothek-Bead-Pellet vollständig zu resuspendieren. Dies ist unerlässlich, um eine konsistente Clusterdichte auf der MiSeqDx-Fließzelle zu erzielen.
21 Halten Sie beim Bibliotheksnormalisierungsschritt die angegebenen Inkubationszeiten ein. Eine unsachgemäße Inkubation kann die Bibliotheksdarstellung und die Clusterdichte beeinträchtigen.
22 Aufgrund der Anzahl an Plattenübertragungen und dem sich daraus ergebenden Kontaminierungspotenzial müssen Sie äußerste Vorsicht walten lassen, um sicherzustellen, dass der Well-Inhalt vollständig im Well verbleibt. Passen Sie auf, dass der Inhalt nicht verspritzt wird.
23 Die Empfehlung zur Zugabe von 250 ng DNA ermöglicht die DNA-Mengenvariation. Die Leistung des Assays wird durch diese Zugabestufe erhöht.

Verfahrenshinweise

1 Illumina verlangt, dass jeder Lauf, der als parallel zu verarbeitender Satz an Proben definiert ist, eine positive Kontroll-DNA-Probe und eine negative Kontrollprobe (NTC oder No Template Control) enthält. Die positive Kontroll-DNA-Probe muss eine gut charakterisierte Probe mit einer oder mehreren bekannten *CFTR*-Varianten sein. Illumina empfiehlt die Verwendung einer Wildtyp-Kontrollprobe. Die Wildtyp-Kontrollprobe sollte als eine Probe ausgeführt werden und nicht die positive oder negative Kontrollprobe ersetzen.
2 Bevor Sie mit dem MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose beginnen, extrahieren und quantifizieren Sie die DNA.
3 Sie können hierfür ein beliebiges validiertes DNA-Extraktionsverfahren verwenden.

4 Quantifizieren Sie die DNA mit einem Spektralphotometer. Vergewissern Sie sich, dass das A260/A280-Verhältnis der DNA-Probe > 1,5 ist. Normalisieren Sie die DNA-Probe auf 50 ng/µl. Jede Probe muss 5 µl genomische DNA (insgesamt 250 ng) enthalten.

Probendurchsatz und Indexdarstellung

Beim Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose beträgt der Probendurchsatz pro MiSeqDx-Lauf 8 Proben. Die während der PCR-Amplifikation verwendeten Index-Primer müssen auf Basis des gewünschten endgültigen Probendurchsatzes ausgewählt werden, damit Diversität in der Indexsequenz sichergestellt ist.

MiSeqDx verwendet eine grüne LED zum Sequenzieren von G/T-Basen und eine rote LED zum Sequenzieren von A/C-Basen. Um eine ordnungsgemäße Registrierung sicherzustellen, muss in jedem Zyklus mindestens eines der zwei Nukleotide für jeden Farbkanal gelesen werden. Es ist wichtig, die Farbbalance für jede Base des sequenzierten Index-Reads zu halten. Anderenfalls kann bei der Sequenzierung des Index-Reads ein Registrierungsfehler auftreten.

Verwenden Sie den folgenden minimalen Satz an Indizes mit Farbbalance für Sequenzierungsläufe mit acht Proben:

Tabelle 11 Index-Primer-Kombinationen für 8-Proben-Sequenzierungsläufe

	Index-Primer 1 (A701)	Index-Primer 2 (A702)	Index-Primer 10 (A710)
Index-Primer C (A503)	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Index-Primer D (A504)	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Index-Primer E (A505)	Probe 7	Probe 8	--

Wenn keine sechs eindeutigen Proben (ausgenommen die positiven und negativen Kontrollen) verfügbar sind, ist es akzeptabel, den Lauf mit Replikaten von humangenomischen DNA-Proben aufzufüllen.

Gebrauchsanweisung

MiSeqDx-Probenblattvorbereitung

1 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm von Illumina Worklist Manager (IWM) die Option **Create Worklist** (Arbeitsliste erstellen).
2 Wählen Sie im Feld „Test Type“ (Testtyp) die Option **Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay** aus.
3 Geben Sie im Feld „Worklist Name“ (Name der Arbeitsliste) einen Namen für das Probenblatt ein.
   — Wenn für den Namen des Probenblatts die alphanumerische Barcode-ID der Reagenzienkartusche verwendet wird, findet die MiSeq Operating Software (MOS) das Probenblatt automatisch.
   — Wenn ein anderer Name für das Probenblatt verwendet wird, kann die Schaltfläche **Browse** (Durchsuchen) in der MiSeq Operating Software (MOS) verwendet werden, um das entsprechende Probenblatt zu finden.
4 [Optional] Geben Sie eine Beschreibung für den Lauf ein.
5 Stellen Sie sicher, dass das Datum mit dem Startdatum des Laufs übereinstimmt.
6 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Eingeben von Probeninformationen

1 Geben Sie auf der Registerkarte „Table“ (Tabelle) oder „Plate“ (Platte) für jeden Probenwell folgende Informationen ein:
   a **Sample ID** (Proben-ID) – Geben Sie eine eindeutige Proben-ID ein.
   b **Index 1 and Index 2** (Index 1 und Index 2) – Geben Sie den Indexadapter an, der für jedes Index-Read verwendet werden soll.
2 [Optional] Um detailliertere Informationen zu den Proben aufzuzeichnen, geben Sie einen Probennamen und eine Beschreibung ein.

3 [Optional] Wählen Sie zum Angeben von Kontrollen auf der Platte im Dropdown-Menü **Control** (Kontrolle) „Negative“ (Negativ) bzw. „Positive“ (Positiv) aus.
4 Wechseln Sie zur Registerkarte „Plate Graphic“ (Plattengrafik) und verwenden Sie die Option **Copy to Clipboard** (In Zwischenablage kopieren) oder **Print** (Drucken), um ein Bild der Probenplatte zu erfassen.
5 Wählen Sie **Finish** (Fertig stellen).

Hybridisierung des Oligonukleotid-Pools

Vorbereitung

1 Bringen Sie den Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay, den Hybridisierungspuffer, die genomischen DNA-Proben und die positive Kontrollprobe auf Raumtemperatur.
2 Mischen Sie den Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay und den Hybridisierungspuffer kräftig, um sicherzustellen, dass sich alle Ablagerungen vollständig aufgelöst haben. Zentrifugieren Sie dann kurz die Röhrchen, um Flüssigkeit zu sammeln.
3 Erhitzen Sie einen 96-Well-Hitzeblock auf 95 °C.
4 Erwärmen Sie einen Inkubator auf 37 °C.
5 Erstellen Sie die Probenplatte entsprechend der von IWM ausgedruckten Plattengrafik.

Verfahren

1 Stellen Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte (nachstehend als **HYB**-Platte bezeichnet) bereit.
2 Fügen Sie 5 µl Probe oder Kontrolle bei 50 ng/µl (250 ng insgesamt) zu den entsprechenden Wells in der **HYB**-Platte hinzu. Folgen Sie dem generierten Plattenlayout, um eine korrekte Well-Auswahl vorzunehmen.
3 Fügen Sie 5 µl Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay zu allen Wells hinzu, die genomische DNA enthalten.
4 Fügen Sie 40 µl Hybridisierungspuffer zu jeder Probe in der **HYB**-Platte hinzu. Pipettieren Sie drei- bis fünfmal leicht auf und ab, um zu mischen.
5 Verschließen Sie die **HYB**-Platte und zentrifugieren Sie 1000 × g eine Minute lang bei 20 °C.
6 Legen Sie die **HYB**-Platte in dem mit 95 °C vorgeheizten Block ab und inkubieren Sie sie eine Minute lang.
7 Verringern Sie die Temperatur des Hitzeblocks auf 40 °C und fahren Sie mit der Inkubation fort, bis der Hitzeblock 40 °C erreicht (etwa 80 Minuten).
Die allmähliche Abkühlung ist für eine ordnungsgemäße Hybridisierung kritisch. Deshalb werden PCR-Thermocycler mit aktiver Kühlung (z. B. Peltier, thermoelektrisch gekühlt) für diesen Vorgang nicht empfohlen.

SICHERER HALTEPUNKT
Nachdem der Hitzeblock 40 °C erreicht hat, bleibt die **HYB**-Platte zwei Stunden lang bei 40 °C stabil.

Entfernen von ungebundenen Oligonukleotiden

Vorbereitung

1 Bringen Sie die Extension-Ligation-Mischung, den stringenten Wasch-Puffer und den universellen Wasch-Puffer auf Raumtemperatur und mischen Sie diese dann kurz mit dem Vortexer.
2 Fügen Sie die Filterplatten-Assembly-Einheit (nachfolgend **FPU** bezeichnet) in der entsprechenden Reihenfolge von oben nach unten zusammen: Deckel, Filterplatte, Adapterkranz und MIDI-Platte.
3 Waschen Sie die Filterplattenmembran vorab wie folgt:
   a Fügen Sie 45 µl stringenten Wasch-Puffer zu jedem Well hinzu.
   b Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie fünf Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.

Verfahren

1 Entfernen Sie die **HYB**-Platte aus dem Hitzeblock und zentrifugieren Sie sie eine Minute lang bei 1.000 x g und 20 °C.
2 Übertragen Sie das gesamte Volumen (etwa 55 µl) jeder Probe in die entsprechenden Wells der Filterplatte.
3 Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie fünf Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.
4 Waschen Sie die Filterplatte wie folgt:
   a Geben Sie 45 µl stringenten Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.
   b Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie fünf Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.
5 Wiederholen Sie den Waschvorgang, wie im vorherigen Schritt beschrieben.

HINWEIS
Wenn der Wasch-Puffer nicht vollständig abläuft, zentrifugieren Sie erneut bei 2400 × g und 20° C, bis die gesamte Flüssigkeit durchgelaufen ist (weitere fünf bis zehn Minuten).

6 Entsorgen Sie den gesamten Durchfluss (der Formamid enthält) und setzen Sie dann die **FPU** wieder zusammen.
7 Geben Sie 45 µl universellen Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.
8 Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie zehn Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.

HINWEIS
Stellen Sie sicher, dass die gesamte Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren abgelaufen ist. Wiederholen Sie das Zentrifugieren bei Bedarf.

Extension-Ligation von gebundenen Oligonukleotiden

Verfahren

1 Fügen Sie 45 µl Extension-Ligation-Mischung zu jedem Probe-Well der Filterplatte hinzu.
2 Verschließen Sie die Filterplatte mit klebbarer Aluminiumfolie und decken Sie sie dann mit dem Deckel zu.
3 Inkubieren Sie die **FPU** im vorab erwärmten Inkubator 45 Minuten lang bei 37 °C.

PCR-Amplifikation

Vorbereitung

1 Bereiten Sie frisches 0,05 N NaOH vor.
2 Ermitteln Sie anhand des Plattengrafikausdrucks von Illumina Worklist Manager die zu verwendenden Index-Primer.
3 Bringen Sie die PCR-Master-Mischung und die entsprechenden Index-Primer auf Raumtemperatur. Mischen Sie mit dem Vortexer alle aufgetauten Röhrchen und zentrifugieren Sie sie anschließend kurz.
4 Stellen Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte (nachstehend als **AMP**-Platte bezeichnet) bereit.
5 Fügen Sie anhand des Probenblatts Index-Primer wie folgt zur **AMP**-Platte hinzu:
   a Fügen Sie 4 µl der Index-Primer C (A503), D (A504) und E (A505) zu den entsprechenden Wells in einer Spalte der **AMP**-Platte hinzu.
   b Entsorgen Sie die ursprünglichen weißen Verschlüsse und bringen Sie neue weiße Verschlüsse an.
   c Fügen Sie 4 µl der ausgewählten Index-Primer 1 (A701), 2 (A702) and 10 (A710) zu den entsprechenden Wells in einer Reihe der **AMP**-Platte hinzu. ***Die Spitzen müssen nach jeder Reihe ausgetauscht werden, um eine Index-Kreuzkontaminierung zu vermeiden.***
   d Entsorgen Sie die ursprünglichen orangefarbenen Verschlüsse und bringen Sie neue orangefarbene Verschlüsse an.

6 Bereiten Sie die PCR-Gebrauchslösung aus PCR-Master-Mischung/PCR-Polymerase wie folgt vor:
   a Fügen Sie 5,6 µl PCR-Polymerase zu 280 µl PCR-Master-Mischung hinzu.
   b Invertieren Sie die vorbereitete PCR-Gebrauchslösung zum Mischen 20-mal.

Verfahren

1 Entnehmen Sie die **FPU** aus dem Inkubator und entfernen Sie die Aluminiumfolieversiegelung.
2 Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie zwei Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.
3 Fügen Sie 25 µl 0,05 N NaOH zu jedem Probe-Well der Filterplatte hinzu. Pipettieren Sie das NaOH 5- bis 6-mal auf und ab.
4 Decken Sie die Filterplatte ab und inkubieren Sie sie fünf Minuten lang bei Raumtemperatur.
5 Übertragen Sie während der Inkubation der Filterplatte 22 µl der PCR-Gebrauchslösung in jeden Well der AMP-Platte mit Index-Primern.
6 Übertragen Sie die vom Filter eluierten Proben wie folgt zur AMP-Platte:
   a Pipettieren Sie die Proben in der ersten Spalte der Filterplatte 5- bis 6-mal auf und ab.
   b Übertragen Sie 20 µl von der Filterplatte zur entsprechenden Spalte der **AMP**-Platte.
   c Pipettieren Sie leicht 5- bis 6-mal auf und ab, um die DNA mit der PCR-Gebrauchslösung gründlich zu mischen.
   d Übertragen Sie in ähnlicher Weise die verbleibenden Spalten von der Filterplatte zur **AMP**-Platte. ***Die Spitzen müssen nach jeder Spalte ausgetauscht werden, um Index- und Probenkreuzkontaminierungen zu vermeiden.***
7 Versiegeln Sie die **AMP**-Platte und sichern Sie den Verschluss mit einer Gummiwalze.
8 Zentrifugieren Sie eine Minute lang bei 1000 × g und 20 °C.
9 Übertragen Sie die **AMP**-Platte in den Nachamplifikationsbereich.
10 Führen Sie mithilfe des folgenden Programms auf einem Thermocycler eine PCR durch:
   — 95 °C für 3 Minuten
   — 25 Zyklen von:
      — 95 °C für 30 Sekunden
      — 62 °C für 30 Sekunden
      — 72 °C für 60 Sekunden
   — 72 °C für 5 Minuten
   — Halten Sie die Temperatur konstant bei 10 °C

SICHERER HALTEPUNKT

Falls Sie nicht gleich mit der PCR-Reinigung fortfahren, kann die **AMP**-Platte über Nacht auf dem Thermocycler bleiben oder sie kann bei 2 °C bis 8 °C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden.

PCR-Reinigung

Vorbereitung

1 Bringen Sie die PCR-Reinigungs-Beads auf Raumtemperatur.
2 Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol aus reinem Ethanol zu.

Verfahren

1 Zentrifugieren Sie die AMP-Platte eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C.
2 Stellen Sie eine neue MIDI-Platte (nachstehend als **CLP**-Platte bezeichnet) bereit.
3 Invertieren Sie die PCR-Reinigungs-Beads 10-mal. Mischen Sie kräftig mit dem Vortexer und invertieren Sie erneut 10-mal. Inspizieren Sie die Lösung visuell, um sicherzugehen, dass die Beads resuspendiert sind.
4 Fügen Sie 45 µl PCR-Reinigungs-Beads zu jedem Well der **CLP**-Platte hinzu.
5 Übertragen Sie das vollständige PCR-Produkt von der AMP- zur **CLP**-Platte.

6 Versiegeln Sie die **CLP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler zwei Minuten lang bei 1800 rpm.
7 Inkubieren Sie 10 Minuten lang bei Raumtemperatur, ohne zu schütteln.
8 Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf einem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.
9 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ, entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.
10 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ und waschen Sie die Beads wie folgt:
   a Fügen Sie jedem Probe-Well 200 µl frisch zubereitetes 80%iges Ethanol hinzu.
   b Inkubieren Sie die Platte auf dem Magnetstativ mindestens 30 Sekunden bzw. so lange, bis der Überstand klar ist.
   c Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.
11 Wiederholen Sie den Waschvorgang, wie im vorherigen Schritt beschrieben.
12 Verwenden Sie eine auf 20 µl eingestellte P20-Mehrkanalpipette, um überflüssiges Ethanol zu entfernen.
13 Entfernen Sie die **CLP**-Platte vom Magnetstativ und lassen Sie die Beads 10 Minuten lang an der Luft trocknen.
14 Fügen Sie 30 µl Elutionspuffer zu jeder Probe hinzu und mischen Sie dies dann kurz mit dem Vortexer.
15 Versiegeln Sie die **CLP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler zwei Minuten lang bei 1800 rpm. Überprüfen Sie nach dem Schütteln, ob die Proben resuspendiert sind. Wiederholen Sie diesen Schritt, wenn dies nicht der Fall ist.
16 Inkubieren Sie zwei Minuten lang bei Raumtemperatur.
17 Platzieren Sie die **CLP**-Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf dem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.
18 Stellen Sie eine neue MIDI-Platte (nachstehend als **LNP**-Platte bezeichnet) bereit.
19 Übertragen Sie 20 µl des Überstands von der **CLP**-Platte auf die **LNP**-Platte.
20 [Optional] Übertragen Sie die verbleibenden 10 µl Überstand von der **CLP**-Platte auf eine neue Platte und beschriften Sie diese Platte mit einem Laufnamen und Datum. Lagern Sie diese Platte bis zum Ende des Sequenzierungslaufs und der Datenanalyse bei -25 °C bis -15 °C. Die gereinigten PCR-Produkte können im Falle von Probenfehlern zur Fehlerbehebung verwendet werden.

SICHERER HALTEPUNKT
Wenn Sie den Vorgang an diesem Punkt beenden, versiegeln Sie die **LNP**-Platte und zentrifugieren Sie sie eine Minute lang bei 1000 × g und 20 °C. Die Platte ist bis zu drei Stunden lang bei 2 °C bis 8 °C stabil.

Bibliotheksnormalisierung

Vorbereitung

1 Bereiten Sie frisches 0,1N NaOH vor.
2 Bringen Sie den Bibliotheksnormalisierungsverdünner, die Bibliothek-Beads und den Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer auf Raumtemperatur.
3 Mischen Sie den Bibliotheksnormalisierungsverdünner kräftig mit dem Vortexer und stellen Sie sicher, dass alle Ausfällungen vollständig aufgelöst wurden.
4 Mischen Sie die Bibliothek-Beads kräftig eine Minute lang mit dem Vortexer (zeitweilig mit Inversion), bis die Beads resuspendiert sind und sich kein Pellet im unteren Bereich des Röhrchens befindet, wenn das Röhrchen invertiert wird.

Verfahren

1 Mischen Sie den Bibliotheksnormalisierungsverdünner und die Bibliothek-Beads in einem frischen 1,5-ml-Röhrchen wie folgt:
   a Fügen Sie 394 µl Bibliotheksnormalisierungsverdünner hinzu.
   b Pipettieren Sie die Bibliothek-Beads 10-mal auf und ab, um zu resuspendieren.

HINWEIS

Es ist äußerst wichtig, das Bibliothek-Bead-Pellet im unteren Bereich des Röhrchens vollständig zu resuspendieren. Durch die Verwendung einer P1000 wird sichergestellt, dass die Beads homogen resuspendiert werden und sich keine Bead-Masse im unteren Bereich des Röhrchens befindet. Dies ist unerlässlich, um eine einheitliche Clusterdichte auf der Fließzelle zu erzielen.

   c Geben Sie mit einer Pipette 72 µl Bibliothek-Beads in das Röhrchen mit Bibliotheksnormalisierungsverdünner.
   d Mischen Sie die Lösung, indem Sie das Röhrchen 15- bis 20-mal invertieren.
2 Geben Sie 45 µl der kombinierten Bibliotheksnormalisierungsverdünner/Bibliothek-Beads-Gebrauchslösung in jeden Well der **LNP**-Platte mit den Bibliotheken.
3 Versiegeln Sie die **LNP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler 30 Minuten lang bei 1800 rpm.
4 Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf einem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.
5 Lassen Sie die **LNP**-Platte auf dem Magnetstativ, entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.
6 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und waschen Sie die Beads mit Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer wie folgt:
   a Geben Sie 45 µl Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.
   b Versiegeln Sie die **LNP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler fünf Minuten lang bei 1800 rpm.
   c Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf dem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.
   d Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.
7 Wiederholen Sie den Bibliotheksnormalisierungs-Waschvorgang, wie im vorherigen Schritt beschrieben.
8 Verwenden Sie eine auf 20 µl eingestellte P20-Mehrkanalpipette, um überflüssigen Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer zu entfernen.
9 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und fügen Sie 30 µl 0,1 N NaOH zu jedem Well hinzu.
10 Versiegeln Sie die **LNP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler fünf Minuten lang bei 1800 rpm.
11 Stellen Sie während der fünfminütigen Elution eine neue 96-Well-PCR-Platte (nachstehend als **SGP**-Platte bezeichnet) bereit.
12 Fügen Sie 30 µl Bibliothek-Lagerungspuffer zu jedem Well hinzu, der in der **SGP**-Platte verwendet werden soll.
13 Stellen Sie nach Beendigung der fünfminütigen Elution sicher, dass alle Proben in der **LNP**-Platte vollständig resuspendiert sind. Falls die Proben nicht vollständig resuspendiert sind, pipettieren Sie diese Proben behutsam auf und ab oder klopfen Sie die Platte leicht gegen die Bank, um die Beads zu resuspendieren, und schütteln Sie sie für weitere 5 Minuten.
14 Platzieren Sie die **LNP**-Platte mindestens zwei Minuten lang auf dem Magnetstativ.
15 Übertragen Sie den Überstand von der **LNP**- auf die **SGP**-Platte. Pipettieren Sie leicht 5-mal auf und ab, um zu mischen.
16 Verschließen Sie die **SGP**-Platte und zentrifugieren Sie sie anschließend eine Minute lang bei 1000 × g und 20 °C.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie nicht gleich mit dem Bibliotheks-Pooling und der anschließenden Sequenzierung auf dem MiSeqDx fortfahren, bewahren Sie die versiegelte **SGP**-Platte bis zu 3 Tage bei -25 °C bis -15 °C auf.

Bibliotheks-Pooling

Vorbereitungen für Bibliotheks-Pooling

1 Erhitzen Sie einen für 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen passenden Hitzeblock auf 96 °C.
2 Bereiten Sie in einem Eiskübel ein Eiswasserbad vor. Kühlen Sie den Bibliothek-Verdünnungspuffer im Eiswasserbad.
3 Beginnen Sie mit dem Auftauen der MiSeqDx-Reagenzienkartusche.

Vorbereiten einer frischen Verdünnung von NaOH

ACHTUNG!
Die Verwendung von frisch verdünntem NaOH ist notwendig, um die Proben für die Clusterbildung auf dem MiSeqDx vollständig zu denaturieren.

1 Mischen Sie die folgenden Volumina in einem Mikrozentrifugenröhrchen:
   — DNase-, RNase-freies Wasser (900 µl)
   — Stock 1.0 N NaOH (100 µl)
2 Invertieren Sie das Röhrchen zum Mischen mehrmals.

Interne PhiX-Kontrolle denaturieren und verdünnen

1 Mischen Sie folgende Volumina, um die Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek auf 2 nM zu verdünnen:
   — 10 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek (2 µl)
   — 1X TE-Puffer (8 µl)
2 Mischen Sie folgende Volumina, um eine 1 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek zu erhalten:
   — 2 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek (10 µl)
   — 0,1 N NaOH (10 µl)
3 Mischen Sie die Lösung mit 1 nM Interne PhiX-Kontrolle kurz mit dem Vortexer.
4 Zentrifugieren Sie die Matrizenlösung eine Minute lang bei 280 x g und 20 °C.
5 Inkubieren Sie die Lösung 4,5 Minuten lang bei Raumtemperatur, um die Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek in Einzelstränge zu denaturieren.
6 Geben Sie das folgende Volumen von vorgekühltem Bibliothek-Verdünnungspuffer in das Röhrchen mit denaturierter Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek, um eine 20 pM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek zu erhalten.
   — Denaturierte Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek (20 µl)
   — Vorgekühlter Bibliothek-Verdünnungspuffer (980 µl)

Vorbereiten der Reagenzienkartusche

1 Tauen Sie die MiSeqDx-Reagenzienkartusche - Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay in einem Wasserbad auf, das ausreichend raumtemperiertes deionisiertes Wasser enthält, um die Basis der Reagenzienkartusche bis zur auf der Reagenzienkartusche aufgedruckten Wasserlinie einzutauchen. Das Wasser darf die maximale Wasserlinie nicht übersteigen.
2 Lassen Sie die Reagenzienkartusche im raumtemperierten Wasserbad etwa eine Stunde oder so lange auftauen, bis sie vollständig aufgetaut ist.
3 Nehmen Sie die Kartusche aus dem Wasserbad und klopfen Sie sie vorsichtig auf dem Tisch ab, um das Wasser von der Basis der Kartusche zu entfernen. Trocknen Sie die Basis der Kartusche ab. Stellen Sie sicher, dass kein Wasser auf die Oberseite der Reagenzienkartusche gespritzt ist.

Überprüfen der Reagenzienkartusche

1 Invertieren Sie die Reagenzienkartusche zehnmal, um die aufgetauten Reagenzien zu mischen, und überprüfen Sie anschließend visuell, ob alle Positionen aufgetaut sind.

HINWEIS
Es ist äußerst wichtig, dass die Reagenzien in der Kartusche vollständig aufgetaut und gemischt sind, damit eine ordnungsgemäße Sequenzierung sichergestellt werden kann.

2 Überprüfen Sie visuell das Reagenz in Position 1, um sicherzustellen, dass es vollständig gemischt ist und keine Ausfällungen enthält.
3 Klopfen Sie die Kartusche vorsichtig auf dem Tisch ab, um Luftblasen in den Reagenzien zu entfernen.

ANMERKUNG
Die MiSeqDx-Sipper-Röhrchen reichen bis zum Boden der einzelnen Behälter, um die Reagenzien zu aspirieren. Deshalb ist es wichtig, dass sich keine Luftblasen in den Behältern befinden.

4 Lagern Sie die Reagenzienkartusche auf Eis bzw. lagern Sie sie bei 2 °C bis 8 °C (bis zu sechs Stunden), bis Sie den Lauf konfigurieren können. Die besten Ergebnisse erzielen Sie, wenn Sie direkt mit dem Laden der Probe und dem Konfigurieren des Laufs fortfahren.

Vorbereiten von Proben für die Sequenzierung

1 Bringen Sie den Bibliothek-Verdünnungspuffer auf Raumtemperatur. Mischen Sie den Bibliothek-Verdünnungspuffer kräftig mit dem Vortexer und stellen Sie sicher, dass alle Ausfällungen vollständig aufgelöst wurden.
2 Wenn die **SGP**-Platte gefroren gelagert wurde, tauen Sie die **SGP**-Platte bei Raumtemperatur auf.
3 Zentrifugieren Sie die **SGP**-Platte eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C.
4 Stellen Sie ein neues Eppendorf-Gefäß (nachfolgend als **PAL**-Röhrchen bezeichnet) bereit.
5 Wenn die **SGP**-Platte gefroren gelagert wurde, mischen Sie jede zu sequenzierende Bibliothek, indem Sie 3- bis 5-mal auf- und abpipettieren.
6 Übertragen Sie 5 µl jeder zu sequenzierenden Bibliothek von der **SGP**-Platte auf einen PCR-8-fach-Röhrchenstreifen. Verschließen Sie die **SGP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung und legen Sie sie beiseite.

HINWEIS
Bewahren Sie die versiegelte **SGP** -Platte bei -25 °C bis -15 °C auf. Die versiegelte **SGP**-Platte kann maximal 3 Tage lang aufbewahrt werden.

7 Kombinieren und übertragen Sie den Inhalt des PCR-8-fach-Röhrchenstreifens in das **PAL**-Röhrchen. Mischen Sie das **PAL**-Röhrchen gründlich mit dem Vortexter.
8 Stellen Sie ein neues Eppendorf-Gefäß (nachfolgend als **DAL**-Röhrchen bezeichnet) bereit.
9 Geben Sie 585 µl Bibliothek-Verdünnungspuffer in das **DAL**-Röhrchen.
10 Geben Sie 6 µl von 20 pM Interne PhiX-Kontrolle in das **DAL**-Röhrchen. Pipettieren Sie 3- bis 5-mal auf und ab, um die Spitze zu spülen und eine vollständige Übertragung sicherzustellen.
11 Übertragen Sie 9 µl **PAL** in das **DAL**-Röhrchen, das Bibliothek-Verdünnungspuffer enthält. Pipettieren Sie 3- bis 5-mal auf und ab, um die Spitze zu spülen und eine vollständige Übertragung sicherzustellen.
12 Mischen Sie das **DAL**-Röhrchen mit dem Vortexer bei höchster Geschwindigkeit.
13 Zentrifugieren Sie das **DAL**-Röhrchen eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C.
14 Inkubieren Sie das **DAL**-Röhrchen bei 96 °C zwei Minuten lang auf einem Hitzeblock.
15 Invertieren Sie das **DAL**-Röhrchen nach der Inkubation ein- bis zweimal, um es gut zu mischen, und legen Sie es dann sofort in das Eiswasserbad.
16 Belassen Sie das **DAL**-Röhrchen fünf Minuten lang im Eiswasserbad.

Laden der Probenbibliotheken in eine Kartusche

1 Verwenden Sie eine separate, saubere und leere 1-ml-Pipettenspitze, um die Verschlussfolie über dem mit **Load Samples** (Proben laden) bezeichneten Behälter auf der Reagenzienkartusche zu durchstechen.
2 Geben Sie mit der Pipette 600 µl der Probenbibliotheken in den Behälter **Load Samples** (Proben laden). Achten Sie beim Zuführen der Probe darauf, die Verschlussfolie nicht zu berühren.

Überprüfen Sie nach dem Laden der Probe, ob sich Luftblasen im Behälter befinden. Falls Luftblasen vorhanden sind, klopfen Sie die Kartusche vorsichtig auf den Tisch, damit die Blasen entweichen.

3 Fahren Sie mit den Schritten zum Einrichten des Laufs unter Verwendung der MiSeq Operating Software (MOS)-Benutzeroberfläche fort.

Interpretation der Ergebnisse

Der Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose ist für die Sequenzierung aller proteincodierenden Regionen im *CFTR*-Gen über die 27 Exone zwischen 5 und 30 Basen flankierender intronischer Sequenz, ca. 100 nt flankierender Sequenz an den 5′- und 3′-UTRs und zwei tiefen intronischen Mutationen (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T) konzipiert. Die genauen sequenzierten Regionen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Außerdem liefert der Assay Ergebnisse über die PolyTG/PolyT-Variante und zwei große Deletionen (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23).

1 Der Assay-Bericht listet die Probennamen und den Genotyp für jede in einer Probe nachgewiesene Variante auf.
   - Es werden für jede Variante die genomische Koordinate, der cDNA-Name der Human Genome Variation Society (HGVS) und der Proteinname (sofern verfügbar) angegeben.
   - Beim Varianten-Typ handelt es sich um eine einzelne Nukleotidvariante (Single Nucleotide Variant, SNV), eine Deletions-/Insertionsvariante (DIV), eine PolyTG/PolyT-Variante (PolyTGPolyT) oder eine große Deletion (DEL).
   - Der Genotyp-Call (heterozygot oder homozygot) kann der Referenzbaseninformation entnommen werden, die die Referenzsequenz an dieser genomischen Koordinate angibt, sowie der Ergebnisbeschreibung, die die beiden Allele an der genomischen Position in der Probe bereitstellt. Wenn beispielsweise die Referenz „G“ und das Ergebnis „A/G“ ist, weist dies auf eine G>A-Änderung an dieser genomischen Koordinate hin und bedeutet, dass der Genotyp des Variantenallels heterozygot ist. Wenn die Referenz „G“ und das Ergebnis „T/T“ ist, weist dies auf eine G>T-Änderung an dieser genomischen Koordinate hin und bedeutet, dass der Genotyp des Variantenallels homozygot ist.
   - Die Sequenzierungstiefe an der Variantenposition wird im Feld „Depth“ (Tiefe) und die Allelhäufigkeit wird im Abschnitt „Frequency“ (Häufigkeit) angegeben.
2 Der Assay-Bericht enthält Informationen zur Proben-Call-Rate für jede Probe. Die Call-Rate wird berechnet als die Anzahl der Variantenpositionen/-regionen, die einen vordefinierten Konfidenzschwellenwert erreichen, geteilt durch die Gesamtzahl der untersuchten Positionen/Regionen.
   - Die genomische Koordinate einer Position oder Region, bei der der Konfidenzwert unter dem Schwellenwert liegt, wird separat im Abschnitt „Coordinates not called“ (Koordinaten ohne Call) aufgeführt. Benutzer sollten die Positionen, bei denen kein Call erfolgte, anhand der jeweiligen Varianteninformationen prüfen, um möglicherweise nicht entdeckte Varianten zu identifizieren, sowie die entsprechenden Bevölkerungshäufigkeiten, um festzustellen, ob eine Probe wiederholt werden muss.
3 Ein Probenergebnis wird nur dann als gültig betrachtet, wenn die Call-Rate mindestens 99 % beträgt. Wenn die Call-Rate unter 99 % beträgt, wird die Leistung als „Fail“ (Fehlgeschlagen) angegeben und die Probe muss wiederholt werden.
4 Es wird empfohlen, alle Varianten, die sich außerhalb dessen befinden, was in der Genauigkeitsstudie validiert wird (siehe *Genauigkeit* auf Seite 24), mithilfe einer validierten Referenzmethode zu verifizieren, bevor ein Bericht über das erste Patientenergebnis mit diesen Varianten erstellt wird.

   HINWEIS: Es sollte eine Haplotyp-Phasierung in Betracht gezogen werden, wenn zwei oder mehr Varianten nachgewiesen werden.
5 Alle Varianteninterpretationen sollten von einem zertifizierten klinischen Molekulargenetiker oder einem äquivalenten Spezialisten gemäß lokalen Verfahren und Richtlinien durchgeführt werden[11]. Zu den potenziellen Interpretationsreferenzen gehören unter anderem: CFTR2-Datenbank[12,13], Sosnay-Papier[10], ACMG-Richtlinien von 2004 [14] und die Committee Opinion des ACOG von 2011[8].

Informationen zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse bzw. zur Beschreibung des Inhalts in einem Bericht im Textdateiformat finden Sie unter *MiSeq Reporter – Benutzerhandbuch (Teile-Nr. 15038356_DEU)*.

6 Der Genetiker hat die Möglichkeit, in einem Dropdown-Menü der MiSeq Reporter-Software einen Interpretationswert für jede Variante einzugeben, die für eine Probe gemeldet wurde. Es stehen folgende Interpretationswerte zur Auswahl: CF-verursachend, Mutation von variierender klinischer Konsequenz, Mutation von unbekannter Signifikanz oder nicht CF-verursachend. Der eingegebene Wert wird an die Ergebnisdatei angehängt und in der Interpretationsspalte im Bericht des klinischen Sequenzierungs-Assays angezeigt.

Verfahren zur Qualitätskontrolle

Die guten Laborpraktiken schreiben vor, dass Kontrollproben evaluiert werden müssen, um Unterschiede bei der Blutverarbeitung und bei technischen Verfahren im Labor des Benutzers zu erkennen, die zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen können.

1 **Positive Kontrollproben** – Eine positive DNA-Kontrollprobe ist bei jedem Lauf erforderlich. Die positive Kontroll-DNA-Probe muss eine gut charakterisierte Probe mit mindestens einer bekannten CFTR-Variante sein[15]. Illumina empfiehlt die Verwendung rotierender positiver Kontrollproben, die den technischen Standards und Richtlinien des ACMG von 2008 für CF-Mutationstests[16] und den klinischen Laborstandards für die Sequenzierung der nächsten Generation des ACMG aus dem Jahr 2013 entsprechen[17]. Die positive Kontrollprobe muss den erwarteten Genotyp generieren. Wenn die positive Kontrollprobe einen anderen als den erwarteten Genotyp generiert, ist möglicherweise ein Fehler bei der Probenverfolgung oder eine fehlerhafte Aufzeichnung von Index-Primern aufgetreten. Der gesamte Assay muss wiederholt werden, angefangen mit der Bibliotheksvorbereitung.

2 **Negative Kontrollprobe (Keine Matrize/Keine DNA)** – Die Verwendung einer negativen Kontrollprobe (keine Matrize/keine DNA) ist bei jedem Lauf erforderlich, um mögliche Kontaminationsvorkommnisse zu entdecken. Die Call-Rate sollte bei der negativen Kontrollprobe weniger als 10 % betragen. Wenn eine negative Kontrollprobe eine Call-Rate von mehr als 10 % generiert, ist während der Assay-Verarbeitung möglicherweise eine Kontamination aufgetreten. Der Assay wird als fehlgeschlagen angesehen und der gesamte Assay muss wiederholt werden, angefangen mit der Bibliotheksvorbereitung.

3 **Wildtyp-Kontrollprobe** – Die Wildtyp-DNA-Kontrollprobe wird bei jedem Lauf empfohlen. Die Wildtyp-Kontrollprobe muss eine gut charakterisierte Probe sein, die keine CFTR-Varianten enthält. Die Wildtyp-Kontrollprobe muss den erwarteten Genotyp generieren. Wenn die Wildtyp-Kontrollprobe einen anderen als den erwarteten Genotyp generiert, ist möglicherweise ein Fehler bei der Probenverfolgung oder eine fehlerhafte Aufzeichnung von Index-Primern aufgetreten. Der gesamte Assay muss wiederholt werden, angefangen mit der Bibliotheksvorbereitung.

4 Vor der anfänglichen Verwendung dieses Produkts im Labor des Benutzers sollte die Leistung des Assays durch das Testen mehrerer positiver und negativer Kontrollproben mit bekannten Leistungsmerkmalen verifiziert werden.

5 Alle Qualitätskontrollen sollten in Übereinstimmung mit den lokalen, bundes- und/oder landesweiten Vorschriften oder Zulassungsanforderungen durchgeführt werden.

Leistungsmerkmale

Genauigkeit

Die Genauigkeit des Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose ergab sich aus der Auswertung von 500 Proben, die eine Vielzahl von CFTR-Varianten aus vier verschiedenen Quellen repräsentieren. Die primäre Quelle der Genauigkeitsdaten war eine klinische Genauigkeitsstudie, die mit einem Panel aus 366 Proben durchgeführt wurde. Die Mehrzahl (n = 355) der Proben bestand aus archivierten, anonymisierten klinischen gDNA-Proben, die aus menschlichem Blut isoliert wurden. Die restlichen 11 Proben wurden aus im Handel erhältlichen Zelllinienproben gewonnen.

Die Daten dieser Studie wurden durch Genauigkeitsdaten von 68 Zelllinienproben, die in der Reproduzierbarkeitsstudie untersucht wurden, 14 klinischen Proben aus der analytischen Studie zur Auswertung der Extraktionsmethode sowie 52 synthetischen Plasmidproben ergänzt. Die synthetischen Plasmide wurden so konstruiert, dass sie den genomischen Kontext seltener Varianten enthielten, und umfassten zwischen einer bis zehn Varianten innerhalb desselben Konstrukts. Sie wurden linearisiert, auf der genomischen DNA mit entsprechenden Kopienzahlen verdünnt und mit menschlichen genomischen DNA-Proben des Wildtyp-Genotyps bei äquivalenten Kopienzahlen gemischt, um eine heterozygote Probe zu imitieren.

Beim MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose wurden insgesamt 5.206 Positionen mit den Referenzmethoden der bidirektionalen Sequenzierung nach Sanger und den PCR-Tests verglichen. Die Genotypisierungsergebnisse für SNV- und kleine InDel-Stellen einschließlich der PolyTG/PolyT-Region wurden mit der bidirektionalen Sanger-Sequenzanalyse verglichen.

Zwei validierte PCR-basierte Assays wurden als Referenzmethode für die beiden großen Deletionen im Panel verwendet. Jeder doppelte PCR-Assay nutzte zwei Primer-Sätze, um zwischen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Genotypen zu unterscheiden. Einer der Primer-Sätze diente dazu, die Deletionshaltepunkte zu flankieren, während der andere Satz eine in der Deletion befindliche Region amplifizierte. Die zwei Produkte wurden anhand von Größentrennung auf einem Agarosegel nachgewiesen. Die PCR-Assays wurden anhand eines Panels aus insgesamt 28 Proben (22 Proben für jede Deletion) validiert, die aus Zelllinien und aus Blut gewonnenen genomischen DNA-Proben sowie synthetischen Plasmiden bestanden, die den WT-, HET- und HOM-Genotyp für jede große Deletion umfassten. Anhand der Untersuchung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel wurde bestätigt, dass die PCR-Assays eine 100%ige Spezifität und Reproduzierbarkeit für alle getesteten Proben aufwiesen. Die Genauigkeit der PCR-Assays wurde anhand der Sanger-Sequenzierung bestätigt und für 100 % aller Proben nachgewiesen.

Für jeden Genotyp wurde die Genauigkeit anhand von drei statistischen Messgrößen ermittelt. Die positive Übereinstimmung (Positive Agreement, PA) wurde für jede Genotyp-Variante berechnet, indem die Anzahl der Proben mit übereinstimmenden Varianten-Calls durch die Gesamtzahl der Proben mit dieser Variante, wie anhand der Referenzmethoden ermittelt, dividiert wurde. Die negative Übereinstimmung (Negative Agreement, NA) wurde über alle Wildtyp(WT)-Positionen hinweg berechnet, indem die Anzahl der konkordanten WT-Positionen durch die Gesamtzahl der WT-Positionen, wie in den Referenzmethoden ermittelt, dividiert wurde. Die allgemeine Übereinstimmung (Overall Agreement, OA) wurde über alle berichteten Positionen hinweg berechnet, indem die Anzahl der konkordanten WT- und Varianten-Positionen durch die Gesamtzahl der berichteten Positionen, wie in den Referenzmethoden ermittelt, dividiert wurde.

Der MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose hatte einen PA von 99,66 % auf Genotypebene, einschließlich PolyTG/PolyT-Varianten (100 % ohne PolyTG/PolyT-Varianten). Der NA-Wert für alle WT-Positionen war > 99,99 % und der OA-Wert für alle gemeldeten Positionen war ebenfalls > 99,99 %.

Tabelle 12 Gesamt-Genauigkeit des MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Exon1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Exon1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A >G	SNV	Exon1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_273+10250 del21kb	DEL	Intron1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C >T	SNV	Exon2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C >T	SNV	Exon2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G >T	SNV	Exon3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C >T	SNV	Exon3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C >T	SNV	Exon3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G >A	SNV	Exon3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C >T	SNV	Exon3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Exon3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G >A	SNV	Exon3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Exon3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G >A	SNV	Intron3	0	0	1	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
406-1G>A	c.274-1G >A	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G >A	SNV	Exon4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G >T	SNV	Exon4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C >T	SNV	Exon4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Exon4	0	2	0	0	0	100
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Exon4	0	0	1	0	0	100
D110H	c.328G >C	SNV	Exon4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C >T	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G >A	SNV	Exon4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Exon4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Exon4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Exon4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C >A	SNV	Exon4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G >T	SNV	Intron4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Intron4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Exon5	1	0	1	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
G178R	c.532G >A	SNV	Exon5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G >T	SNV	Intron5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A >G	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G >A	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G >T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C >T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C >T	SNV	Exon6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T >G	SNV	Exon6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Exon6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C >T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T >G	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Exon6	0	0	1	0	0	100
E279D	c.837A >T	SNV	Exon7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G >A	SNV	Exon8	2	0	0	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
1078delT	c.948delT	DIV	Exon8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T >G	SNV	Exon8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G >T	SNV	Exon8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C >T	SNV	Exon8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T >A	SNV	Exon8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C >T	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_1023insTC	DIV	Exon8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T >C	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G >A	SNV	Exon8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Exon8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G >A	SNV	Exon8	5	0	0	0	0	100
Q359K/T360K	c.[1075C>A;1079C>A]	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G >A	SNV	Intron8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_1128insA	DIV	Exon9	0	0	2	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
W401X(c.1202G>A)	c.1202G >A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
W401X(c.1203G>A)	c.1203G >A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G >A	SNV	Intron9	0	0	2	0	0	100
PolyTGPolyT	N/A	PolyTG PolyT	Intron9	369	79	52	3	4#	98,60
1461ins4	c.1329_ 1330ins AGAT	DIV	Exon10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C >A	SNV	Exon10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G >A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C >A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C >G	SNV	Exon11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T >C	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Exon11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Exon11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C >T	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G >C	SNV	Exon11	1	0	0	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
S489X	c.1466C >A	SNV	Exon11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C >T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C >T	SNV	Exon11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A >G	SNV	Exon11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Exon11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Exon11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
F508C	c.1523T >G	SNV	Exon11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Exon11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G >T	SNV	Exon11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C >T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A >G	SNV	Exon11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Exon11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Intron11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G >A	SNV	Exon12	4	1	0	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
G542X	c.1624G>T	SNV	Exon12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A >C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G >A	SNV	Exon12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T>G)	c.1647T >G	SNV	Exon12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Exon12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C >T	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Exon12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A >G	SNV	Exon12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T >C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G >A	SNV	Exon12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G >A	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Exon12	6	1	0	0	0	100
1811+1.6kb A>G	c.1679+1.6 kbA>G	SNV	Intron12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G >A	SNV	Exon13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G >A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
V562I	c.1684G >A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T >G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
P574H	c.1721C >A	SNV	Exon13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G >C	SNV	Exon13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A >G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G >T	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G >A	SNV	Intron13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A >G	SNV	Intron13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A >G	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A >G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Exon14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G >A	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Exon14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Exon14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Exon14	3	1	0	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
2184delA	c.2052delA	DIV	Exon14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Exon14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C >A	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C >T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A >T	SNV	Exon14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G >A	SNV	Exon14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Exon14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T >G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2347delG	c.2215delG	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
P750L	c.2249C>T	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G >A	SNV	Exon14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C >T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G >T	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G >T	SNV	Intron14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G >T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
D836Y	c.2506G >T	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G >A	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C >T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Exon15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Exon15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A >G	SNV	Exon15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_ 2657+3insA	c.2657+2_ 2657+3insA	DIV	Intron16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G >A	SNV	Intron16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C >T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T >C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C >T	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T >C	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Exon17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G >A	SNV	Exon17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G >C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
S977F	c.2930C >T	SNV	Exon18	0	0	1	0	0	100
3120G>A	c.2988G >A	SNV	Exon18	1	0	0	0	0	100
3120+1G>A	c.2988+1G >A	SNV	Intron18	7	1	0	0	0	100
3121-1G>A	c.2989-1G >A	SNV	Exon19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G >C	SNV	Exon19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Exon19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Intron19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T >G	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T >C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C >T	SNV	Exon20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G >A	SNV	Exon20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G >A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C >T	SNV	Exon20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G >A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T >C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0¥	100
W1089X	c.3266G >A	SNV	Exon20	4	0	0	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
Y1092X (C>A)	c.3276C >A	SNV	Exon20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C >G	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A >T	SNV	Exon20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Exon20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G >T	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A >T	c.3368-2A >T	SNV	Intron20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G >C	SNV	Exon21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T >A	SNV	Exon21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Exon22	7	1	0	0	0	100
R1162X	c.3484C >T	SNV	Exon22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G >T	SNV	Exon22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Exon22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C >G	SNV	Exon22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G >A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G >A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
3791delC	c.3659delC	DIV	Exon22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A >G	SNV	Exon22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T >G	SNV	Exon22	9	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Intron22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G >A	SNV	Exon23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Exon23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G >A	SNV	Exon23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Exon23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G >A	SNV	Exon23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G >A	SNV	Exon23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A >G	SNV	Exon23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G >A	SNV	Intron23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Exon24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A >G	SNV	Exon24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C >G	SNV	Exon24	9	1	0	0	0	100

Genotyp (Allgemeiner Name/cDNA-Name/Koordinate)	cDNA-Name	Variantentyp	CFTR-Gen-Region (hg19)	Positive Calls (Varianten)			No Calls*	Miscalls	Positive Übereinstimmung
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben			
Q1313X	c.3937C >T	SNV	Exon24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G >A	SNV	Exon25	0	1	0	0	0	100
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Exon25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	DEL	Intron24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Exon27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Exon27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Exon27	150	32	0	0	0	100
Alle Varianten (PA) insgesamt†				2072			3	4	99,66
Alle WT (NA) insgesamt				2600928			1	2§	> 99,99
Gesamtzahl aller WT und Varianten (OA)				2603000			4	6	> 99,99

DIV ist ein Akronym für Deletions-/Insertions-Variante.
* Proben wurden nicht erneut getestet.
^ Software gibt nicht den cDNA-Namen für diese genomische Koordinate an.
** Im Sanger-Bericht wurde die P205S-Variante für die klinische Probe als heterozygot aufgeführt. Eine Prüfung der Sanger-Daten zeigte jedoch, dass die Variante homozygot war und falsch gemeldet wurde. MiSeqDx meldete die Variante als homozygot.
# Eines der diskordanten Ergebnisse stammte aus der Reproduzierbarkeitsstudie. Das PolyTG/PolyT-Ergebnis der Probe war bei allen 18 Replikaten konkordant, bei der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung jedoch diskordant.
¥ Bei der ursprünglichen synthetischen heterozygoten Probe wurde festgestellt, dass diese nicht korrekt vorbereitet wurde. Als sie nach der erneuten Vorbereitung mit demselben Plasmid getestet wurde, wurde sie nachgewiesen.
† PA ohne PolyTG/PolyT-Calls betrug 100 %.
§ Eine synthetische, für Exon8 heterozygote Probe wurde für die Variante CFTR dele22, 23 als heterozygot gemeldet. Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieses Ergebnis wahrscheinlich von einer geringfügigen Kontamination herrührte. Außerdem konnten bei einer zweiten Probe die Sanger-Primer die Variante Q1463Q aufgrund von Indels sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts der Variantenstelle nicht vollständig nachweisen.

Tabelle 13 Genauigkeit der PolyTG/PolyT-Variante für den MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose

PolyTGPolyT-Genotyp	Anzahl der klinischen Proben	Anzahl der Zelllinienproben	Anzahl der synthetischen Proben	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“*	% Genauigkeit
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50,00
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,31
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100

PolyTGPolyT-Genotyp	Anzahl der klinischen Proben	Anzahl der Zelllinienproben	Anzahl der synthetischen Proben	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“*	% Genauigkeit
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Summe	448			4	3	98,44

* Proben wurden nicht erneut getestet.
^ Eines der diskordanten Ergebnisse stammte aus der Reproduzierbarkeitsstudie. Das PolyTG/PolyT-Ergebnis der Probe war bei allen 18 Replikaten konkordant, bei der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung jedoch diskordant.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des MiSeqDx-Systems für zystische Fibrose wurde anhand einer Blindstudie an drei Teststandorten und mit zwei Bedienern an jedem Standort ermittelt. Zwei gut charakterisierte Panels mit jeweils 46 Proben wurden an jedem Standort von beiden Bedienern getestet. Daraus ergaben sich 276 Probenergebnisse pro Bediener. Die Panels enthielten eine Mischung aus genomischer DNA aus lymphoblastoiden Zelllinien mit bekannten Mutationen im *CFTR*-Gen sowie leukozytenbereinigte Blutproben, die mit lymphoblastoiden Zelllinien mit bekannten Mutationen im *CFTR*-Gen versetzt wurden. Die Blutproben wurden bereitgestellt, um die Inkorporation der Extraktionsschritte zum Vorbereiten der gDNA zu ermöglichen, die als primäre Zugabe für den Assay-Workflow dient.

Die Proben-First-Pass-Rate, definiert als die Anzahl der Proben, die beim ersten Versuch den QC-Kennzahlen entsprechen, betrug 99,7%. Alle Ergebnisse basieren auf anfänglichen Tests.

Der PA auf Genotypebene betrug für alle Varianten einschließlich der PolyTG/PolyT-Variante 99,22 % und ohne die PolyTG/PolyT-Variante 99,60 %. Der NA-Wert für alle WT betrug 99,70 % und der OA-Wert für alle gemeldeten Positionen betrug ebenfalls 99,70 %. Der PA-Wert für die PolyTG/PolyT-Variante betrug 97,83 %.

Tabelle 14 Reproduzierbarkeit des MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose (ohne PolyTG/PolyT-Varianten)

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
1	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.1646G >A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1581A >G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1680-1G >A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.3870A >G	P1290P	6	18	6	5	6	0	1	94,44
2	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1477C >T	Q493X	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
4	c.1408G>A	V470M	6	18	5	6	6	1	0	94,44

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
4	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.2052delA	2184delA	6	18	5	6	6	1	0	94,44
5	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.224G>A	R75Q	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.2562T>G	T854T	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.3472C>T	R1158X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.366T>A	Y122X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.625G>T	A209S	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C >T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.3846G >A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
9	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.3140-26A>G	3272-26A>G	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
10	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
11, 39	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2002C>T	R668C	12	36	12	12	12	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
11, 39	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G >A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.489+1G >T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.178G >T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.3080T>C	I1027T	6	18	6	6	6	0	0	100
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.3528delC	3659delC	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.-4G >C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G >A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G >T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
19	c.579+1G >T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G >A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G >T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C >A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.3276C >A	Y1092X(C>A)	6	18	6	6	6	0	0	100
24, 45	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
24, 45	c.3909C >G	N1303K	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.4046G >A	G1349D	12	36	12	12	12	0	0	100
25	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G >C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.91C >T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.3485G >T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1585-1G >A	1717-1G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C >T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C >T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.3368-2A >T	c.3368-2A >T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T >G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G >A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G >C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1007T >A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T >G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
38	c.1727G >C	G576A	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2002C>T	R668C	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2057C >A	S686Y	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2657+5G >A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_ 273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97,22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G >A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
50, 88	c.220C >T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G >A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.262_263delTT	394delTT	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T >G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G >C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.3209G >A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G >C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.3205G >A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T >G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.2260G >A	V754M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.988G >T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G >A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G >A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T >G	S549R (c.1647T>G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G >A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2506G >T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2537G >A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G >T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G >T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G >T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A >G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C >T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1721C >A	P574H	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C >A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.489+1G >T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A >G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G >A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A >G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C >T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G >A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G >C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100

Probe	HGVS-Name (oder Standort wenn kein HGVS)	Varianten-Name	Ergebnisse gesamt		Übereinstimmende Calls			Summe* (Alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls€	Miscalls	
83	c.-4G >C	11720145	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.350G >A	R117H	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Alle Varianten (PA) insgesamt (einschließlich PolyTG/PolyT-Daten in Tabelle 15)**			2580	7740	2562	2553	2565	37	23	99,22
Alle WT (NA) insgesamt			2871132	8613396	2865930	2855526	2865932	26006	2	99,70
Gesamtzahl aller WT und Varianten (OA)			2873712	8621136	2868492	2858079	2868497	26043	25	99,70

€ Proben wurden nicht neu getestet.
^ Je ein Replikat der Proben 5 und 75 hatte eine Call-Rate von 0 %. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Proben vor der Bibliotheksvorbereitung wahrscheinlich nicht zur Probenplatte hinzugefügt wurden.
* Untersuchungen zeigten, dass die Proben 9 und 10 vor der Bibliotheksvorbereitung wahrscheinlich vom Bediener vertauscht wurden.
** Ohne PolyTG/PolyT-Varianten betrug der PA 99,60 %.

Tabelle 15 PolyTG/PolyT-Reproduzierbarkeit für das MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose

Panel	Probe	Genotyp	Anzahl Ergebnisse		Übereinstimmende Calls			Summe (alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls	Miscalls	
A	1	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	2	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	3	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	4	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
A	5	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
A	6	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	7	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	8	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	9	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	10	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	11, 39	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	12, 40	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	13	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	14	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	15	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
A	16	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	17, 41	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%

Panel	Probe	Genotyp	Anzahl Ergebnisse		Übereinstimmende Calls			Summe (alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls	Miscalls	
A	18, 42	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	19	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	20, 43	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22%
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	4	4	4	0	77.78%
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
A	34	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%

Panel	Probe	Genotyp	Anzahl Ergebnisse		Übereinstimmende Calls			Summe (alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls	Miscalls	
A	35	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	36	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	37	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	38	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	47, 85	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	48, 86	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	11	11	12	2	0	94,44%
B	49, 87	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	50, 88	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%

Panel	Probe	Genotyp	Anzahl Ergebnisse		Übereinstimmende Calls			Summe (alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls	Miscalls	
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	5	2	0	88.89%
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%

Panel	Probe	Genotyp	Anzahl Ergebnisse		Übereinstimmende Calls			Summe (alle Standorte)		% Übereinstimmung
			Pro Standort	Alle Standorte	Standort 1	Standort 2	Standort 3	No Calls	Miscalls	
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11(T)9	6	18	0	0	0	0	18*	0%
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
PolyTG/PolyT-Varianten (PA) insgesamt			552	1656	537	540	543	17	19	97.83%

* Alle 18 Proben waren miteinander konkordant, aber nicht mit der bidirektionalen Sequenzierung nach Sanger.

DNA-Extraktion

Drei häufig verwendete, im Handel erhältliche Extraktionsmethoden, die magnetische Bead-Extraktion, die Alkoholpräzipitation und die Isolation mittels Kieselgelsäule, wurden unter Verwendung von mit K_2EDTA antikoaguliertem Vollblut geprüft. Bei der Studie wurden insgesamt 14 Blutproben verwendet. Zwei davon waren Wildtypproben, die übrigen enthielten eindeutige Genotypen, die neun verschiedene Varianten darstellten, darunter sowohl häufige als auch seltene Varianten. Für die polyTG/polyT-Variation wurden Proben mit (T)5-9 und (TG)10-12 berücksichtigt. Die drei DNA-Extraktionsmethoden wurden von zwei verschiedenen Bedienern unabhängig getestet, von denen jeder drei Läufe pro Extraktionsmethode durchgeführt hat. Jede Extraktion wurde vom jeweiligen Bediener an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Die DNA-Konzentration und das A260/A280-Verhältnis der extrahierten gDNA-Proben wurden mithilfe der Spektralfotometrie ermittelt. Die Gesamtzahl der Proben für jede Extraktionsmethode der Studie ist 168 (14 Proben x 2 Bediener/Extraktionsmethode x 3 Läufe/Bediener x 2 Replikate/extrahierte gDNA-Probe).

Extraktionsmethode	Anzahl der getesteten Proben	Call-Rate	Genauigkeit	Proben-First-Pass-Rate*
Alkoholpräzipitation	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Kieselsäurefiltersäulen-Isolation	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Extraktion des magnetischen Bead	168	> 99,99%	> 99,99%	100%

* Prozent der Proben mit einer Call-Rate von über 99 % im ersten Lauf

DNA-Zugabe

Der DNA-Zugabebereich des Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose wurde untersucht, indem eine Studie zur seriellen Verdünnung mit 14 repräsentativen DNA-Proben durchgeführt wurde, die 16 eindeutige CF-Varianten enthielt. Jede Probe wurde bei 9 DNA-Zugabestufen von 1250 ng bis 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng und 1 ng) doppelt getestet. Zur Ermittlung der Genauigkeit wurden Genotyp-Proben mit bidirektionalen Sequenzierungsdaten nach Sanger und die Deletionen mit einem PCR-Assay verglichen. 1250 ng und 25 ng wurden als Ober- und Untergrenze für die DNA-Zugabe identifiziert, da sie eine Proben-First-Pass-Rate von ≥ 95 % ohne falsche Calls (100 % Genauigkeit und Call-Rate) hatten.

Die DNA-Zugaben von 1250 ng, 250 ng und 100 ng wurden mit vier repräsentativen DNA-Proben und mindestens 20 Replikaten pro DNA-Zugabestufe für jede Probe (n=4x20=80 Proben) weiter getestet, während die Untergrenze von 25 ng mit 14 Proben und 20 Replikaten für jede Probe (n=14x20=280 Proben) getestet wurde. Die Genauigkeit und die Proben-First-Pass-Rate betrugen bei allen DNA-Zugabestufen 100 %.

Störende Substanzen

Um die Auswirkungen störender Substanzen auf das Illumina MiSeqDx-System für zystische Fibrose zu untersuchen, wurde die Leistung des Assays mit und ohne potenzielle Störsubstanzen überprüft. In dieser Studie wurden sechzehn Vollblutproben mit eindeutigen CF-Genotypen getestet. Vier körpereigene störende Substanzen (Bilirubin, Cholesterin, Hämoglobin und Triglyceride) wurden getestet, indem die Blutproben vor der DNA-Extraktion mit diesen versetzt wurden. Die Konzentrationsgrenzen für jede Substanz sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Um darüber hinaus die Störungen aufgrund der Blutentnahme (geringe Menge) zu untersuchen, wurden die Blutproben mit EDTA versetzt, und um die Störungen aufgrund der Probenvorbereitung zu untersuchen, wurde der endgültige Wasch-Puffer aus einer Kieselgelsäulen-Isolationsmethode zur bereinigten genomischen DNA zugefügt.

Der MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose erzielte mit und ohne störende Substanzen eine Call-Rate von 100 % bei allen Proben und eine Reproduzierbarkeit von 100 % in Genotyp-Calls zwischen Proben. Es wurden keine Störungen durch eine der endogenen oder exogenen Störsubstanzen beobachtet.

Um die Auswirkungen der Multiplexierung von Index-Primer-Störungen zu untersuchen, wurde eine Kreuzkontaminationsstudie mit zwei Proben, von der jede eindeutige homozygote Genotypen an vier unterschiedlichen genomischen Positionen aufwies, und zwei entsprechenden Index-Primern durchgeführt. Es wurde keine Änderung beim Varianten-Calling bei Kontaminationsgraden von unter 40 % beobachtet. Der Probengenotyp wurde heterozygot, wenn der Kontaminationsgrad mindestens 40 % betrug.

Testsubstanz	Gesamtzahl der Replikate	Im Blut getestete Konzentration (Obergrenze)	Im Blut getestete Konzentration (Untergrenze)	Call-Rate
Bilirubin	16	684 µmol/L	137 µmol/L	100%
Cholesterin	16	13 mmol/L	2,6 mmol/L	100%
Hämoglobin	16	2 g/L	0,4 g/L	100%
Triglycerid	16	37 mmol/L	7,4 mmol/L	100%
EDTA	16	7,0 mg/ml	2,8 mg/ml	100%

Quellen

1 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations – Correlation With Incidence Data and Application to Screening. Human Mutation 19:575 606.

2 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. Genetics in Medicine 10(12):851–868.

3 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Verfügbar unter www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [Online] Aktualisiert am 19. Februar 2008.

4 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Verfügbar unter www.uptodate.com. [Online] 07. Dezember 2012.

5 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr 153(2):S4–S14.

6 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.

7 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Verfügbar unter www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] August 2013.

8 Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.

9 Rohlfs EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic fibrosis carrier testing in an ethnically diverse US population. Clinical Chemistry; 57(6): 841–848.

10 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Nat Genet. 25. August [zuerst elektronisch veröffentlicht].

11 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cystic Fibrosis 7:179–196.

12 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Verfügbar unter www.cftr2.org. [Online] August 2013.

13 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Verfügbar unter www.nacfconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [Online] Im Namen des CFTR2-Projekts von Garry Cutting bei der 25th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) präsentiert und von der Cystic Fibrosis Foundation gesponsert. 04. November 2011. Anaheim, CA.

14 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. Genetics in Medicine 6(5): 387–391.
15 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (Mai 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. Journal of Molecular Diagnostics 11(3): 186–193.
16 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (2008 Edition, Revised 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
17 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genetics in Medicine. Genetics in Medicine 15(9): 733–747.

Patente und Marken

Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und verbundenen Unternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Dokument und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichem Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN, ODER JEDER ANDEREN ART DER VERWENDUNG DER PRODUKTE AUSSERHALB DES GÜLTIGKEITSBEREICHS DER AUSDRÜCKLICHEN SCHRIFTLICHEN LIZENZEN ODER DER DURCH ILLUMINA GENEHMIGTEN ZULASSUNGEN IN VERBINDUNG MIT DEM ERWERB DER PRODUKTE DURCH DEN KUNDEN.

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

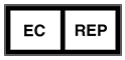
© 2012-2104 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Illumina und **MiSeqDx** sind Marken oder eingetragene Marken von Illumina, Inc. Alle anderen hierin enthaltenen Marken und Namen sind Eigentum der jeweiligen Eigentümer.

AMPure, Beckman und Beckman Coulter sind Marken oder eingetragene Marken der Beckman Coulter, Inc.

Kontaktinformationen

Illumina
San Diego, Kalifornien 92122, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH Den Haag
Niederlande

Produktkennzeichnungen

Der mit jedem Kit versendete Symbolschlüssel enthält eine vollständige Referenz der Symbole, die auf der Produktverpackung und -beschriftung verwendet werden.